

Aus dem
Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
PD Dr. C.A. Deeg

Untersuchung der Bindungsspezifität und Identifikation von Zielproteinen intraokulärer IgM-Antikörper bei der equinen rezidivierenden Uveitis

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Margarete Swadzba
aus
Königshütte

München 2013

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. Cornelia Deeg
Korreferent/en:	Univ.-Prof. Dr. Dr. Michael H. Erhard Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann Priv.-Doz. Dr. Sven Reese Priv.-Doz. Dr. Johann Maierl

Tag der Promotion: 09. Februar 2013

Meiner Familie.

1 EINLEITUNG	7
2 LITERATUR	8
2.1. Equine rezidivierende Uveitis	8
2.1.1. Krankheitsbild	8
2.1.2. Bedeutung der ERU in der Veterinärmedizin	8
2.1.3. Autoimmune Uveitis des Menschen	9
2.1.4. Experimentelle autoimmune Uveitis.....	10
2.1.5. ERU als spontanes Tiermodell für die autoimmune Uveitis	12
2.1.6. Ätiologie und Pathomechanismen der ERU.....	14
2.1.6.1. Pathologische Vorgänge am Zielorgan	14
2.1.6.2. Immunologische Aspekte der ERU	15
2.2. Autoantigene und ihre Bedeutung für die ERU	16
2.2.1. Identifizierte Autoantigene bei der ERU.....	16
2.2.2. Methoden zur Identifikation von unbekannten Autoantigenen ..	18
2.2.3. Bedeutung und Nutzen der Identifikation von Autoantigenen ...	20
2.2.4. Bedeutung der Autoantikörperantwort bei der ERU.....	22
2.2.5. Der Glaskörper als Probenmaterial bei der ERU	24
3 PUBLIKATION	26
4 DISKUSSION	34
5 ZUSAMMENFASSUNG	58
6 SUMMARY	60
7 LITERATURVERZEICHNIS	62
DANKSAGUNG	83

°C	Grad Celsius
μ	Mikro, 10 ⁻⁶
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
1D	Eindimensional
2D	Zweidimensional
Abb.	Abbildung
AQP	Aquaporin
ARVO	Engl.: Association for Research in Vision and Ophthalmology
AU	Autoimmune Uveitis des Menschen
BGB	Bürgerliches Gesetzbuch
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Engl. Cluster of differentiation
CRALBP	Engl.: Cellular retinaldehyde binding protein Zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DNA	Engl.: Deoxyribonucleic acid Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-DNA
EAU	Experimentelle autoimmune Uveitis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Engl. Enzyme-linked immunosorbent assay
ERU	Engl.: Equine recurrent uveitis Equine rezidivierende Uveitis
EU	Europäische Union
Fc (region)	Engl. Fragment crystallizable (region)
Fig.	Engl.: Figure
GADA	Engl.: Glutamic acid decarboxylase antibody
h	Stunde
HLA	Engl.: Human leukocyte antigen
IA2A	Engl.: Tyrosine phosphatase IA2 antibody
IAA	Engl.: Insulin autoantibody
ICA	Engl.: Islet cell antibody
IgG	Immunoglobulin der Klasse G
IgM	Immunoglobulin der Klasse M
INL	Engl.: Inner nuclear layer Innere Körnerschicht
IPL	Engl.: Inner plexiform layer Innere plexiforme Schicht
IRBP	Engl.: Interphotoreceptor retinoid binding protein Interphotorezeptor Retinoid bindendes Protein
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt

LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
LRP4	Low-density lipoprotein receptor-related protein
M	Molar
mM	Milimolar
MALDI	Engl.: Matrix-assisted Laser Desorption / Ionization Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation
MHC	Engl.: Major histocompatibility complex Haupthistokompatibilitätskomplex
MOG	Engl. Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem Massenspektrometrie
MuSK	Muskelspezifische Tyrosinkinase
MW	Engl.: Molecular Weight Molekülmasse
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NF-H	Neurofilament-H
NF-L	Neurofilament-L
NF-M	Neurofilament-M
nm	Nanometer
OD	Engl.: Optical density
ONL	Engl. Outer nuclear layer Äußere Körnerschicht
OPL	Engl.: Outer plexiform layer Äußere plexiforme Schicht
<i>P</i>	Signifikanz
PBS	Engl.: Phosphate buffered saline Phosphatgepufferte Salzlösung
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylendifluorid
RGC	Engl.: Retinal ganglion cell Retinale Ganglionzelle
RT	Raumtemperatur
S-Antigen	Engl.: Soluble Antigen
SD	Engl.: Standard deviation Standardabweichung
SDS	Engl.: Sodium dodecylsulfate Natriumlaurylsulfat
TBS	Engl.: Tris-buffered saline Tris-gepufferte Salzlösung
TI	Engl.: Thymus-independent
TOF	Engl.: Time-of-flight
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
V	Volt

1 EINLEITUNG

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine zur Erblindung führende autoimmun-medierte Augenerkrankung bei Pferden, die von spontan auftretenden und abklingenden intraokulären Entzündungsschüben gekennzeichnet ist und mit ca. 10% weltweit eine hohe Prävalenz hat (Spiess 2010).

Die Bedeutung der ERU reicht sogar über den veterinärmedizinischen Bereich hinaus, da sie aufgrund ihrer großen Ähnlichkeit mit der autoimmunen Uveitis des Menschen als derzeit einziges spontanes Tiermodell für diese Erkrankung im Einsatz ist (Deeg et al. 2008). Ergebnisse, die im Rahmen der ERU-Forschung gewonnen wurden (Deeg et al. 2006b), konnten direkt auf Patienten mit autoimmuner Uveitis übertragen werden (Deeg et al. 2007b; Garip et al. 2009). So wurde Cellular retinaldehyde binding protein (CRALBP) zunächst als neues Autoantigen bei der ERU identifiziert (Deeg et al. 2006b) und erwies sich bei einem späteren Experiment als ebenfalls relevant für die autoimmune Uveitis des Menschen (Deeg et al. 2007b; Garip et al. 2009). Neben CRALBP sind als weitere Autoantigene für die ERU unter anderem die retinalen Proteine S-Antigen und Interphotorezeptor Retinoid bindendes Protein (IRBP) beschrieben worden (Deeg et al. 2001). Gegen diese beiden Proteine wurde eine intraokuläre IgG-Antikörperreaktion bei 72% der ERU Pferde nachgewiesen (Deeg et al. 2001). Jedoch wurde im Zusammenhang mit ERU noch nie die Spezifität autoreaktiver, intraokulärer IgM-Antikörper untersucht. Dieser Aspekt könnte sich als relevant für die ERU-Pathogenese erweisen, da es im Rahmen ihres chronisch-rezidivierenden Verlaufes zu intra- und intermolekularem Spreading kommt, infolge dessen sich das targetierte Autoantigenspektrum verändert (Deeg et al. 2006a). Die Identifikation von Zielstrukturen einer intraokulären IgM-Antwort könnte dazu beitragen, neu entstehende Autoreaktivitäten schon frühzeitig zu erkennen. Aufgrund dessen war das Ziel dieser Studie, das Vorhandensein einer autoreaktiven IgM-Immunantwort im Zielorgan der ERU nachzuweisen, die Spezifität dieser intraokulären IgM-Antwort bei der ERU festzustellen und mögliche, neue potenzielle Autoantigene zu identifizieren.

2 LITERATUR

2.1. Equine rezidivierende Uveitis

2.1.1. Krankheitsbild

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine bei Pferden auftretende Augenerkrankung, welche im Endstadium zur Erblindung des betroffenen Tieres führt (Paglia et al. 2004; Regan et al. 2012). Sie ist gekennzeichnet durch sich wiederholende Zyklen symptomfreier Phasen und akuter Entzündungsschübe (Gilger 2010), die mit zunehmender Anzahl oft immer schwerer werden (Schwink 1992) und zur irreversiblen, progressiven Zerstörung der inneren Augenstrukturen, insbesondere des Zielgewebes Retina, führen (Deeg et al. 2002a). Zu den typischen histopathologischen Kennzeichen der ERU zählen zelluläre Infiltrate in der Retina, Zerstörung der Photorezeptoren und Auflösung der retinalen Architektur bis hin zu einer Netzhautablösung (Deeg et al. 2002a). Klinisch zeigen sich in der schmerzhaften, akuten Entzündungsphase Blepharospasmus, Miosis und Photophobie (Spiess 1997).

2.1.2. Bedeutung der ERU in der Veterinärmedizin

Das Krankheitsbild der ERU ist schon seit mehreren hundert Jahren (Paglia et al. 2004; Spiess 2010) in der Veterinärmedizin bekannt, und wurde in der Vergangenheit mit unterschiedlichen Namen bezeichnet. Lange Zeit war die Bezeichnung „Mondblindheit“ umgangssprachlich, aber auch in rechtsverbindlichen Texten gebräuchlich. So wurde die ERU unter dem Namen „Mondblindheit“ in §§ 481 bis 492 alter Fassung des deutschen Bürgerlichen Gesetzbuchs (BGB) und in der „Kaiserliche(n) Verordnung betreffend die Hauptmängel und Gewährfristen beim Viehhandel vom 27. März 1899“ erwähnt (Gesetzestext abgerufen über <http://de.wikisource.org>; zuletzt geprüft 21.März 2013), welche bis zu ihrer Streichung und Ablösung durch EU-Gesetzgebung im Jahr 2002 (siehe BGB aktuelle Fassung, abgerufen über <http://dejure.org/gesetze/BGB>; zuletzt geprüft 21.März 2013) den Viehhandel noch gesondert vom allgemeinen Kaufrecht regelten. Die ERU war nach der alten Gesetzgebung eine der Viehkrankheiten, die zu den sogenannten

Hauptgewährsmängeln gezählt wurden. Trat einer der Hauptgewährsmängel innerhalb der gesetzlichen Frist von 14 Tagen bei einem erworbenen Tier auf, so hatte der Käufer des Tieres nach fristgerechter Anzeige dieses Mangels Anspruch auf Wandelung, also auf das Rückgängigmachen des Kaufvertrages (siehe §§481 bis 492 BGB alte Fassung; abgerufen über <http://dejure.org/gesetze/0BGB010102>; zuletzt geprüft 21.März 2013). Auch im englischen Sprachraum wurde die Bezeichnung „Mondblindheit“ (engl. „moon blindness“) verwendet (Witzmann 1975; van der Velden 2004). Weitere Bezeichnungen der ERU waren rezidivierende Iridozyklitis (Yager et al. 1950) oder equine periodische Ophthalmie (Barnett 1987). Heutzutage hat sich allgemein die Bezeichnung „equine rezidivierende Uveitis“ oder englisch „equine recurrent uveitis“ durchgesetzt. Insbesondere die Verankerung der rezidivierenden Eigenschaft in der Bezeichnung war hier entscheidend.

Die ERU hat eine Prävalenz von ca. 10% (Spiess 2010) und ist weltweit eine der häufigsten Ursachen für Erblindung bei Pferden (Spiess 1997; Gilger 2010). In der Vergangenheit war die ERU mit ihrer hohen Prävalenz vor allem ein wichtiger ökonomischer Faktor, was bereits James Wardrop im frühen 19. Jahrhundert erkannte (Paglia et al. 2004). Erblindete Pferde waren oft nicht mehr für ihr ursprüngliches Einsatzgebiet tauglich und ihre Besitzer erlitten daraufhin häufig erhebliche wirtschaftliche Einbußen (Paglia et al. 2004).

Heutzutage steht für die Bedeutung der ERU in der Veterinärmedizin vor allem der Tierschutzaspekt im Vordergrund. Zusätzlich zu der Schmerzhaftigkeit akuter Entzündungsschübe stellt für das betroffene Pferd eine Reduktion seiner Sehfähigkeit bis hin zur beidseitigen Erblindung eine erhebliche Verminderung der Lebensqualität dar, da es seine artgerechte Fluchtreaktion bei Gefahrensituationen nicht ausüben kann und somit erheblichem Stress ausgesetzt ist. Auch stellen beidseitig erblindete Pferde durch ihr beeinträchtigtes Orientierungsvermögen oft eine Gefahr für sich selbst und ihre Umwelt dar. Dies macht in vielen Fällen eine Euthanasie des Pferdes notwendig (Eberhardt 2011).

2.1.3. Autoimmune Uveitis des Menschen

Autoimmune Uveitis beim Menschen (AU) ist eine nicht-infektiöse entzündliche Augenerkrankung, die zur Erblindung führt und durch eine autoimmune Reaktion auf

körpereigene Proteine der Retina gekennzeichnet ist (Levy et al. 2011). Diese kann isoliert oder aber gemeinsam mit anderen Manifestationen von Autoimmunerkrankungen, wie Spondyloarthritis (Banares et al. 1998; Gehlen et al. 2012), Vitiligo, Poliosis und reduziertem Hörvermögen beim Vogt-Koyanagi-Harada-Syndrom (Taylor and Lightman 2004; Katsimpris et al. 2011; Kondo et al. 2012) oder mit Systemischem Lupus Erythematoses (Carbone et al. 2006) auftreten. Um die derzeit als Behandlungsmethode übliche systemische Immunsuppression ersetzen zu können, wird in den letzten Jahren nach therapeutischen Alternativen gesucht (Levy et al. 2011; Gomes Bittencourt et al. 2012; Servat et al. 2012). Das Prinzip vieler dieser neuen Therapieansätze, welche auch unter dem Begriff Biologika bekannt sind (Pleyer et al. 2011), ist die selektive Hemmung von Entzündungsmediatoren wie beispielsweise Interleukinen (Tappeiner et al. 2012) oder dem Zytokin Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (Pleyer et al. 2011). Die Wirkstoffe von Biologika sind Proteine (Pleyer et al. 2011), meist Antikörper, die sich gegen die jeweilige Zielstruktur richten (Kotaniemi et al. 2011; Martel et al. 2012). Obwohl eine Therapie mit Biologika sich bei vielen Patienten positiv auf den Krankheitsverlauf auswirkte (Kotaniemi et al. 2011), können auch hier zum Teil schwerwiegende Nebenwirkungen auftreten. So wurden zum Beispiel bei einer Therapie mit Tumor-Nekrose-Faktor-alpha Antagonisten unter anderem eine erhöhte Infektanfälligkeit, die Bildung antinukleärer Antikörper oder Multiple-Sklerose-artige Demyelinisierungszustände als unerwünschte Nebenwirkungen beobachtet (Pleyer et al. 2011).

2.1.4. Experimentelle autoimmune Uveitis

Um elementare Mechanismen der Pathogenese der autoimmunen Uveitis untersuchen zu können, wurden verschiedene induzierbare Uveitis-Tiermodelle entwickelt. Am Anfang der Entwicklung der experimentellen autoimmunen Uveitis (EAU) stand eine periphere Immunisierung mit Gewebeextrakten von Uvea (Wacker et al. 1964) oder Retina (Wacker and Lipton 1965). Meerschweinchen (Wacker et al. 1964; Aronson 1965) oder Kaninchen (Wacker and Lipton 1968a) wurden hierbei als Versuchstiere eingesetzt. Heutzutage basiert die Induktion von EAU vor allem auf den retinalen Proteinen IRBP und S-Antigen (Gasparin et al. 2012). Dabei sind die am häufigsten verwendeten Versuchstiere bei der EAU Ratte und Maus (Agarwal and

Caspi 2004; Caspi 2011). Durch Immunisierung mit S-Antigen lässt sich bei der Ratte eine Uveitis (Wacker 1973; de Kozak et al. 1981) erzeugen. Empfänglich für eine Induktion mittels S-Antigen sind auch Primaten (Faure et al. 1981; Nussenblatt et al. 1981a), Kaninchen (Kalsow and Wacker 1986) und Meerschweinchen (Rao et al. 1979). Für die EAU der Maus ist jedoch die Induktion mit IRBP die Methode der Wahl, da sich die üblicherweise eingesetzten Laborlinien dieser Spezies als resistent gegen die Induktion mit S-Antigen erwiesen (Caspi et al. 1988). Eine Induktion von EAU mittels IRBP ist auch bei Ratten (Chan et al. 1987), Primaten (Hirose et al. 1987; Sanui et al. 1990) sowie Kaninchen möglich (Eisenfeld et al. 1987). Allerdings ist IRBP nur schwach uveitogen bei Meerschweinchen (Vistica et al. 1987). Für die klassischen Labortierspezies Maus und Ratte sind Unterschiede in der Empfänglichkeit bei verschiedenen Linien nachgewiesen worden (Caspi et al. 1992). So werden Ratten der Linien Lewis, CAR und PVG als hoch empfänglich für eine S-Antigen induzierte EAU eingestuft, während die Linien F344, BN, WKAH, AVN und MAXX als wenig empfänglich eingestuft werden (Caspi 2003). Andererseits zeigten sich beispielsweise Ratten der Linie BN in einem Versuch als hoch empfänglich für eine IRBP-induzierte EAU (Fox et al. 1987). Derzeit sind nur sehr wenige Mauslinien bekannt, bei denen eine Induktion der EAU durch Immunisierung mit IRBP möglich ist, die am meisten empfindliche Mauslinie ist dabei B10.RIII (Agarwal and Caspi 2004; Caspi et al. 2008). Diese Unterschiede sind zu einem großen Anteil genetisch bedingt (Caspi 1992; Caspi et al. 1992a; Caspi et al. 1992b), vor allem der Haplotyp des Haupthistokompatibilitätskomplexes (engl. major histocompatibility complex, MHC) hat einen großen Einfluss auf die Empfänglichkeit für EAU, allerdings muss unabhängig von MHC zugleich noch ein permissiver genetischer Hintergrund vorhanden sein, damit eine Maus- oder Rattenlinie empfänglich für EAU ist (Caspi et al. 1992a; Pennesi and Caspi 2002; Mattapallil et al. 2011). Durch das Modell der experimentellen autoimmunen Uveitis (EAU) konnten grundlegende Erkenntnisse über ihre Pathomechanismen gewonnen werden, wie etwa über die zentrale Rolle der T-Lymphozyten. Die Hypothese, dass T-Zellen eine wichtige Rolle bei der EAU spielen (Nussenblatt et al. 1980b), konnte im Rattenmodell bestätigt werden. Im Jahr 1985 gelang es, mittels adoptivem Transfer von T-Zellen, welche aus Ratten mit S-Antigen-induzierter EAU stammten, auch in naiven, nicht-immunisierten Kontrollratten eine EAU zu erzeugen (Mochizuki et al. 1985). In einer weiteren Studie dieser Forschergruppe konnte dann gezeigt werden, dass von einer im Vorhinein

definierten Menge der transferierten T-Zellen, welche den Empfängertieren intraperitoneal gespritzt wurden, nur ein sehr kleiner Bruchteil überhaupt das Auge erreicht, aber dennoch eine EAU auszulösen kann (Palestine et al. 1986). Die Einführung des EAU-Mausmodells bereitete den Weg für eine Vielzahl an genetisch definierten und manipulierbaren Modellen, auf deren Basis auch hoch spezialisierte Studien möglich wurden (Caspi 2011). So wurde beispielsweise ein humanisiertes, transgenes Mausmodell etabliert, bei dem das murine MHC Klasse II Molekül I-A deletiert ist, und dessen Mäuse stattdessen humane Varianten, nämlich HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DQ6 und HLA-DQ8 exprimieren (Das et al. 2000). Für diese Varianten war eine Assoziation mit autoimmunen Erkrankungen wie zum Beispiel rheumatoider Arthritis (HLA-DR4, HLA-DQ8) oder multipler Sklerose (HLA-DR3, HLA-DR4) bereits bekannt (Taneja and David 1999). Wie in der Mutterlinie C57BL/10 ließ sich bei diesen transgenen Tieren mittels IRBP-Immunisierung eine EAU induzieren, allerdings ließ sich bei HLA-DR3 exprimierenden Tieren auch durch Immunisierung mit S-Antigen eine EAU induzieren, was bei nicht-transgenen C57BL/10 Mäusen nicht möglich war (Pennesi et al. 2003). Diese Studie konnte für die autoimmune Uveitis des Menschen unter anderem eine Beteiligung von MHC Klasse II beweisen sowie eine pathologische Relevanz von S-Antigen (Pennesi et al. 2003). Zwar können durch den Einsatz transgener Modelle wertvolle Erkenntnisse gewonnen werden, doch sollte man dabei bedenken, dass sich selbst humanisierte Modelle wie das genannte Beispiel nicht komplett auf den Menschen übertragen lassen. Auch werden bei einem transgenen Tiermodell zwar einzelne Elemente verändert, jedoch ist ein Organismus ein komplexes System und es ist nicht möglich, alle Eigenschaften einer Spezies in anderen Spezies zu simulieren. Des Weiteren ist nicht immer abzusehen, welche Auswirkungen die Manipulation einzelner Gene auf den gesamten Organismus haben wird. Dies hat zur Folge, dass nicht immer alle Parameter erfasst werden können, die sich im Zuge einer genetischen Manipulation verändern und möglicherweise das Ergebnis einer Studie beeinflussen.

2.1.5. Die ERU als spontanes Tiermodell für autoimmune Uveitis

Das derzeit einzige spontane Tiermodell für die humane AU ist die ERU (Deeg et al. 2008), welche mit ihrem chronisch-rezidivierenden Verlauf ein der AU sehr ähnliches Krankheitsbild zeigt (Hines 1984; Deeg et al. 2002a). Eine weitere Eigenschaft des

Pferdemodells ERU ist es, dass die Krankheit, ähnlich wie beim Menschen, spontan in einer genetisch heterogenen Population von Patienten auftritt, im Gegensatz zu Nagermodellen, bei denen nur genetisch sehr eng verwandte Versuchstierpopulationen die Grundlage bilden. Die oft sehr hohe Spezialisierung und Standardisierung im Versuchsaufbau bei Nagermodellen der Uveitis kann je nach untersuchtem Aspekt sehr wertvoll sein, da sie für eine hohe interne Validität sorgt, was bedeutet, dass sich durch die standardisierten Grundvoraussetzungen Beobachtungen im Rahmen einer Studie mit großer Wahrscheinlichkeit auf den untersuchten oder veränderten Parameter zurückführen lassen. Allerdings ist die externe Validität, also die Übertragbarkeit solcher Modelle auf die Feldbedingungen der Wirklichkeit, die sie abbilden sollen, also meist die Situation beim Menschen, im Vergleich oft eher gering (t Hart et al. 2004; Shanks et al. 2009). Auch bietet das Pferd, das dem Menschen durch das spontane Auftreten der Erkrankung in dieser Hinsicht sehr viel näher kommt, den Vorteil, initiiierende Vorgänge studieren zu können, was in den artifiziellen Nagermodellen nicht möglich ist, da diese mit einem im Vorhinein definierten Auslöser erzeugt werden müssen. Dies macht das spontane Pferdemodell ERU zu einer überaus wertvollen Ergänzung zu den Nagermodellen für die Untersuchung der Pathogenese der AU. Auch bietet das Pferdemodell Zugang zu Probenmaterial von Patienten mit breitgefächertem genetischen Hintergrund und in unterschiedlichen Krankheitsstadien, welches in weit größerer Menge gewonnen werden kann, als es beim Menschen möglich wäre, da die Prävalenz von ERU sehr hoch ist und bei ca. 10% weltweit (Spiess 2010) liegt, die von autoimmuner Uveitis des Menschen aber viel geringer ist. In den USA wird sie beispielsweise auf weniger als 5 von 100.000, also 0,005% geschätzt (Cooper and Stroehla 2003). Die Gewinnung von frischem intraokulärem Material ist beim Menschen im Vergleich zum Pferd wegen der einzuhaltenden post-mortem Zeiten unmöglich.

ERU tritt beim Pferd einerseits spontan auf, so wie die autoimmune Uveitis beim Menschen. Andererseits lässt sich beim Pferd mittels Immunisierung mit IRBP auch eine experimentelle Uveitis erzeugen, die klinisch und histopathologisch der spontanen Erkrankung stark ähnelt, sowie re-induzierbar ist mit zuverlässig vorhersagbaren Schüben (Deeg et al. 2002b). Dies ist sonst in keinem induzierbaren Tiermodell möglich, zudem ist die induzierte Erkrankung in der Ratte immer monophasisch (Caspi 2003). Diese Aspekte machen das Pferd zu einem überaus wertvollen Modell, dass sich zwischen die klinische Erkrankung des Menschen und

die induzierten Nagermodelle einreihen lässt, da es die Möglichkeit bietet, ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen interner und externer Validität im Rahmen der Forschung an Modellen autoimmuner Uveitis zu schaffen, indem sich hier die spontane und eine experimentell induzierte Form der Erkrankung in der selben Spezies studieren lassen. Dass Erkenntnisse, die im spontanen Pferdmodell ERU gewonnen wurden, auf die menschliche Erkrankung übertragbar sind, zeigte sich unter anderem bereits mit der Identifikation von CRALBP als neuem Autoantigen bei der ERU (Deeg et al. 2006b) und später auch bei der AU des Menschen (Deeg et al. 2007b).

2.1.6. Ätiologie und Pathomechanismen der ERU

Die Ätiologie der ERU ist noch nicht abschließend geklärt. Die Pathomechanismen der ERU sind aber hauptsächlich von autoimmunen Vorgängen geprägt. Diese seit längerem bestehende Hypothese (Hines 1984) konnte in den letzten Jahren belegt werden (Deeg et al. 2002a; Deeg et al. 2004; Deeg et al. 2006b; Deeg et al. 2011; Degroote et al. 2012).

2.1.6.1. Pathologische Vorgänge am Zielorgan

Das Auge ist im physiologischen Zustand ein immunprivilegiertes Organ (Denniston et al. 2011; Takeuchi 2011; Zhou et al. 2011), da durch die geschlossene Blut-Retina-Schranke eine isolierte Mikroumgebung im Augeninneren geschaffen wird (Runkle and Antonetti 2011). Im Falle einer ERU-Erkrankung infiltrieren Immunzellen das Augeninnere, darunter Iris, Ziliarkörper, Glaskörper und Retina (Kalsow and Dwyer 1998; Gilger et al. 1999; Deeg et al. 2002a). Die Einwanderung der Zellen erfolgt über die vaskularisierten Bereiche der Retina (Deeg et al. 2002a), die sich beim Pferd auf ein begrenztes Gebiet in der Nähe des Nervus opticus beschränkt (Ehrenhofer et al. 2002). Darüber hinaus konnte für späte Stadien ein Zusammenbruch der Blut-Retinaschranke nachgewiesen werden (Deeg et al. 2002a; Deeg et al. 2007a). Erste Anzeichen einer retinalen Schädigung zeigen sich meist in einem Verlust der Photorezeptoraußensegmente, später lassen sich zelluläre Infiltrationen in die Nervenfaserschicht beobachten (Deeg et al. 2002a). Die progressive Zerstörung des Zielgewebes zeigt sich im zunehmenden Verlust von Ganglienzellen und Photorezeptoren, einer Reduktion der Anzahl von Zellkernen in

der inneren und äußeren Körnerschicht und einer Auflösung der retinalen Architektur. Müller-Gliazellen sind in vielen Fällen die einzige retinale Zellart, die sich in späten Stadien noch nachweisen lässt (Deeg et al. 2002a). Im Verlauf der ERU liegen Müller-Gliazellen jedoch im aktivierten Zustand der Gliose vor und verlieren dabei ihre physiologischen Funktionen bei der Kalium- und Wasserhomöostase der Retina (Hauck et al. 2007; Eberhardt et al. 2011) sowie bei der Neuroprotektion (Deeg et al. 2011). Weitere häufige Befunde im Spätstadium der ERU sind ausgeprägte Fibrinablagerungen im Glaskörper, und die Bildung von subretinalen Ödemen, die in einer Netzhautablösung münden kann (Deeg et al. 2002a).

2.1.6.2. Immunologische Aspekte der ERU

Den größten Anteil an den Immunzellen, die das Auge infiltrieren, stellen Lymphozyten, von denen ca. 70% T-Zellen sind (Deeg et al. 2002a). Unter diesen T-Zellen sind am häufigsten CD4⁺ Th1-Lymphozyten vertreten (Gilger et al. 1999; Deeg et al. 2001). Eine Studie in jüngster Zeit, die immunhistochemisch die Expression der Interleukine 6, 17 und 23 in gesunden und von ERU betroffenen Augen untersuchte, erbrachte Hinweise darauf, dass Interleukin-17 sezernierende T-Helfer-Zellen, sogenannte Th17-Zellen, auch einen Teil der infiltrierenden T-Zellpopulation bei der ERU stellen (Regan et al. 2012). Infiltrierende T-Lymphozyten wurden auch in nur schwach geschädigtem Retinagewebe von an ERU erkrankten Pferden in einem frühen Stadium beobachtet, und waren auch in allen späteren Stadien präsent, weshalb davon ausgegangen wird, dass sie ein initialer und treibender Faktor der Pathogenese sind (Deeg et al. 2002a). Ein weiterer entscheidender Hinweis auf die Bedeutung der autoimmunen Komponente der ERU war der Nachweis, dass vitreale T-Lymphozyten autoreaktiv sind und *in vitro* durch retinale Proteine stimuliert werden können (Deeg et al. 2001). Die Hypothese, dass ERU im Wesentlichen einen autoimmunen Hintergrund hat, wird auch gestützt durch das standardmäßige Ansprechen der ERU auf immunsuppressive Therapie (Hines 1984; Gilger et al. 2001). Des Weiteren tritt bei ERU gleichzeitig auch eine Pinealitis bei betroffenen Pferden auf (Kalsow et al. 1992; Kalsow et al. 1993; Kalsow et al. 1999). Dies ist interessant, weil eine begleitende Pinealitis unter anderem auch bei IRBP-induzierter EAU bei Ratten beschrieben wurde, weil das Expressionsmuster des Autoantigens IRBP Retina und Pinealorgan ist (Gery et al. 1986). Auch S-

Antigen wird in beiden Organen exprimiert und ruft bei der EAU der Ratte eine Pinealitis hervor (Mochizuki et al. 1983).

Neben autoaggressiven T-Zellen lässt sich bei ERU-Patienten eine humorale Immunantwort gegen retinale Autoantigene feststellen, sowohl im Serum (Deeg et al. 2006b), als auch intraokulär (Deeg et al. 2001). An der intraokulären Antwort ist besonders interessant, dass sie wahrscheinlich nicht mit dem Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke allein zu erklären ist (Deeg et al. 2007a). So war in einer Studie, die systematisch die vitrealen Proteome gesunder und an ERU erkrankter Pferde verglich, die schwere Kette von IgG bei ERU-Proben heraufreguliert, aber viele andere, ebenfalls hoch abundante Serumproteine wie Hämoglobin konnten nicht nachgewiesen werden (Deeg et al. 2007a). Weitere Hinweise auf eine mögliche intraokuläre Bildung von Antikörpern bei der ERU sind lymphoide Follikel, die vor allem im Ziliarkörper häufig auftreten (Deeg et al. 2002a). Zusätzlich zu den bereits genannten Belegen für die Rolle des erworbenen Immunsystems, gibt es auch Daten, die eine Rolle für das angeborene Immunsystem bei der ERU nahelegen. So fanden sich bereits in einer frühen Studie vereinzelt Proben, in denen Granulozyten, nicht Lymphozyten die dominierende Zellart bei den intraokulären Infiltraten waren (Deeg et al. 2001). Mittels differenzieller Proteomik wurden in einer späteren Studie periphere Blutleukozyten von gesunden Pferden und ERU-Patienten verglichen (Degroote et al. 2012). Hierbei war Talin-1 eines der 17 differenziell exprimierten Proteine, es wurde bei Leukozyten von ERU Patienten vermindert exprimiert. Bei der genaueren Charakterisierung der betroffenen Zellart stellte sich heraus, dass es Granulozyten sind, bei denen Talin-1 herunterreguliert ist (Degroote et al. 2012). Aufgrund seiner physiologischen Funktionen deutet die verminderte Expression von Talin-1 unter anderem auf Veränderungen bei der Motilität und Transmigrationsfähigkeit der betroffenen Zellen hin (Degroote et al. 2012).

2.2. Autoantigene und ihre Bedeutung für die ERU

2.2.1. Identifizierte Autoantigene bei der ERU

Als Zielstrukturen für autoimmune Vorgänge bei der ERU konnten bereits mehrere Autoantigene identifiziert werden (Deeg et al. 2001; Deeg et al. 2006b). Für S-

Antigen und IRBP wurden im Glaskörper von an ERU erkrankten Pferden sowohl spezifische IgG-Antikörper, als auch autoreaktive T-Lymphozyten nachgewiesen (Deeg et al. 2001). Im Tierversuch ließ sich hierbei beobachten, dass sich durch Immunisierung mit IRBP beim Pferd eine rezidivierende Uveitis induzieren ließ (Deeg et al. 2002b). S-Antigen hat im Vergleich dazu nur ein schwaches uveitogenes Potenzial beim Pferd und die mit S-Antigen induzierte Uveitis ähnelte der spontanen Erkrankung kaum (Deeg et al. 2004). Mittels Untersuchung des Bindungsverhaltens von Serum-IgG auf dem retinalen Proteom wurden Autoantigene bei der ERU erstmals *de novo* identifiziert (Deeg et al. 2006b). Eines der neu identifizierten Autoantigene war Recoverin (Deeg et al. 2006b), welches interessanterweise bereits als direkt uveitogen bei der Lewis Ratte beschrieben wurde, bei der es auch eine begleitende Pinealitis auslöste (Gery et al. 1994). Ein weiteres Ergebnis dieser Studie war die Identifikation von CRALBP, welches bis dahin noch nicht im Zusammenhang mit autoimmuner Uveitis beschrieben worden war (Deeg et al. 2006b). Die Reaktion gegen CRALBP als Autoantigen bei der ERU wurde im Laufe dieser Studie ausführlich verifiziert und charakterisiert. Unter anderem wurden hierbei CRALBP-spezifische autoreaktive T-Zellen bei ERU-Patienten nachgewiesen, die bei gesunden Pferden nicht vorhanden waren. CRALBP erwies sich im Tierversuch zudem als uveitogen bei Pferd und Ratte; beim Pferd war die experimentelle Erkrankung darüber hinaus durch wiederholte Immunisierung re-induzierbar (Deeg et al. 2006b). Histopathologisch zeigten sich bei immunisierten Pferden hierbei ein Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke, eine Zerstörung der retinalen Architektur sowie T-Zell-reiche Zellinfiltrate; insgesamt ähnelte das Bild sehr stark dem der spontanen Erkrankung (Deeg et al. 2006b). Dass sich unter den neu identifizierten Autoantigenkandidaten Proteine mit uveitogenem Potenzial befanden, die also möglicherweise hochrelevant für die Pathogenese sind, zeigt auf, wie wichtig es ist, stetig nach Autoantigenen zu suchen. Eine mögliche Relevanz von CRALBP als Autoantigen für die AU des Menschen wurde anschließend durch den Nachweis einer hohen Prävalenz von CRALBP-spezifischen Antikörpern im Serum von menschlichen Patienten mit autoimmuner Uveitis bestätigt (Deeg et al. 2007b, zusätzlich sind CRALBP-spezifische Antikörper auch bei akuter zonaler okkultärer äußerer Retinopathie des Menschen beschrieben worden (Garip et al. 2009; Neutzner et al. 2011)).

2.2.2. Methoden zur Identifikation von unbekannten Autoantigenen

Die Suche nach Autoantigenen bei Autoimmunkrankheiten ist eine Herausforderung, bei der bislang eine Vielzahl von verschiedenen Methoden angewandt wurde. So stand beispielsweise am Anfang der Identifikation von S-Antigen als Autoantigen für Autoimmunuveitis die Immunisierung von Versuchstieren mit unterschiedlichen Gewebeextrakten der Uvea (Wacker et al. 1964), bis schließlich bei Meerschweinchen Uveitis-symptome durch Immunisierung mit Retinaextrakt hervorgerufen werden konnten, was die entscheidende Bedeutung retinaler Antigene bewies (Wacker and Lipton 1965; Wacker and Lipton 1968a). Weiterhin wurde in einer Folgestudie mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion die Antikörperantwort im Serum von mit homologer Retina immunisierten Meerschweinchen untersucht, wobei bestätigt werden konnte, dass die Reaktion spezifisch gegen Retinagewebe gerichtet war. Weiterhin zeigte sich, dass die Antiseren homolog immunisierter Meerschweinchen zwar in gewissem Umfang mit heterologen Retina-Extrakten kreuzreagierten, dass sich in Meerschweinchen aber mit heterologer Immunisierung keine Uveitis erzeugen ließ (Wacker and Lipton 1968b). Auch wurde die Hypothese aufgestellt, dass mindestens zwei verschiedene Antigene von den Antikörpern erkannt wurden, von denen sich je eines in der partikulären Fraktion, das andere in der löslichen Fraktion der Retina befand (Wacker and Lipton 1968b). Allerdings ließen sich bei einer Immunisierung von Meerschweinchen mit der löslichen Fraktion des Retinaextraktes Uveitis-symptome hervorrufen, mit der partikulären Fraktion aber nicht, obwohl die Tiere gegen beide Fraktionen Antikörper entwickelten (Wacker and Lipton 1971). Das Antigen in der partikulären Fraktion wurde in den Außensegmenten von Photorezeptoren geortet (Kalsow and Wacker 1975) und Jahre später als Rhodopsin identifiziert (Gregerson et al. 1981), welches sich in isolierter Form als uveitogen bei der Ratte erwies (Schalken et al. 1988) und bei Meerschweinchen eine Zerstörung innerer und äußerer Segmente der Photorezeptoren sowie später retinaler Ganglienzellen hervorrief, allerdings ohne dass zelluläre Infiltrate in der Retina auftraten (Meyers-Elliott et al. 1983). S-Antigen, dessen Name daher rührt, dass es sich in der löslichen (engl. soluble) Fraktion befand, wurde mit Hilfe von indirekter Immunfluoreszenz in der Retina als Photorezeptor-assoziiert lokalisiert (Kalsow and Wacker 1973). Auch gelang die Induktion einer experimentellen Uveitis mit aus Meerschweinchenretina durch viele

sukzessive Fraktionierungsschritte isoliertem S-Antigen bei Ratten (Wacker and Kalsow 1973) und Meerschweinchen (Wacker 1973). Mit großem Aufwand gelang es schließlich auch, S-Antigen aus bovinem Retinagewebe in größeren Mengen zu isolieren und zu charakterisieren (Wacker et al. 1977), was spätere Versuche erleichterte, da nun ein definiertes Autoantigen zur Verfügung stand (Rao et al. 1979), mit dem man unter anderem weitere Tiermodelle etablieren (de Kozak et al. 1981; Nussenblatt et al. 1981a) und die Immunpathogenese bei AU (Nussenblatt et al. 1980a) und EAU (Nussenblatt et al. 1981b) zielgerichtet untersuchen konnte. Im Vergleich zu S-Antigen war der Zeitraum, den die Identifikation von IRBP in Anspruch nahm, etwas kürzer, da eine begleitende Pinealitis schon für die S-Antigen-induzierte EAU bekannt war (Kalsow and Wacker 1978; Mochizuki et al. 1983) und mit dem gleichzeitigen Vorhandensein von S-Antigen in Retina und Pinealorgan erklärt werden konnte (Mirshahi et al. 1984; Korf et al. 1985; Collin et al. 1986). Da von IRBP bereits bekannt war, dass es ebenfalls in beiden Organen (Pinealorgan und Retina, insbesondere Stäbchen) exprimiert wird (Rodrigues et al. 1986; Wiggert et al. 1986) und da bekannt war, dass Präparationen von Außensegmenten der Stäbchen bei Meerschweinchen eine uveitogene Wirkung hatten (de Kozak et al. 1976), lag es nahe, hier einen möglichen Zusammenhang zu untersuchen. Die Uveitogenität von aus Retinagewebe isoliertem IRBP wurde im Tierversuch nachgewiesen, indem Ratten damit immunisiert wurden und eine Uveitis entwickelten, welche im Vergleich zu der mit S-Antigen induzierten EAU einen akutereren Verlauf hatte (Broekhuysse et al. 1986; Gery et al. 1986). Nachdem frühere Versuche, mittels S-Antigen-Immunisierung in Mäusen EAU zu induzieren, gescheitert waren (Caspi et al. 1988), konnte über IRBP-Immunisierung (Caspi et al. 1988), das EAU-Modell bei der Maus etabliert werden, das inzwischen in der Häufigkeit seiner Verwendung das Rattenmodell überholt hat (Caspi 2011).

Auf humoraler und zellulärer Ebene konnte bei Uveitispatienten eine Reaktion gegen IRBP nachgewiesen werden (Hoekzema et al. 1990; Kijlstra et al. 1990), was eine Relevanz dieses Autoantigens für die menschliche Erkrankung zeigte.

Die Identifikation von Autoantigenen ist auch momentan noch sehr wichtig, und zwar bei allen Autoimmunerkrankungen. Hierbei haben sich proteomische Methoden, insbesondere Identifikation von Autoantigen-Kandidatenproteinen seit einigen Jahren als ein hilfreiches Werkzeug erwiesen (Fathman et al. 2005). Auch im Bereich der ERU-Forschung hat die Einführung proteomischer Methoden wichtige Erkenntnisse

geliefert. So wurden in der Studie, die CRALBP als Autoantigen für die ERU beschrieb (Deeg et al. 2006b), erstmals proteomische Methoden, darunter Massenspektrometrie, gezielt für die Identifikation von neuen ERU-Autoantigenen verwendet. Im Vergleich zur langwierigen Identifikation von S-Antigen, die oben beschrieben wurde, kann eine beobachtete Autoreaktivität nun mittels Massenspektrometrie viel schneller einem bestimmten Protein zugeordnet werden. Allerdings sind kandidatspezifische Verifizierungsschritte nötig, um die Spezifität der Reaktion zu bestätigen (Deeg et al. 2006b).

2.2.3. Bedeutung und Nutzen der Identifikation von Autoantigenen

Im Rahmen der Uveitisforschung (Ko et al. 2011; Kim et al. 2011), sowie bei zahlreichen anderen Autoimmunerkrankungen wie Lupus Erythematoses (Katsumata et al. 2011; Ndhlovu et al. 2011), werden gegenwärtig immer noch weitere, bisher unbeschriebene Autoantigene aktiv gesucht und auch identifiziert. Die Gründe hierfür sind vielfältiger Natur. Die Beschreibung neuer Autoantigene in einer Autoimmunerkrankung kann dazu beitragen, bestimmte Symptome oder Krankheitsbilder auf molekularer Ebene zu verstehen oder sogar neu zu definieren. Ein aktuelles Beispiel aus der Humanmedizin hierfür ist die Identifikation von Aquaporin-4 (AQP4) als Zielstruktur von Autoantikörpern bei Neuromyelitis optica, deren Krankheitsbild zuvor für eine Erscheinungsform von Multipler Sklerose gehalten wurde (Papadopoulos and Verkman 2012). In Folge dieser Identifikation war die Symptomatik vieler Patienten nun erklärbar (Lennon et al. 2005) und führte auch dazu, dass Patienten mit Neuromyelitis optica von Patienten mit Multipler Sklerose unterschieden werden konnten (Lennon et al. 2004). Zwar gibt es noch keine kausale Therapie für betroffene Patienten (Sellner et al. 2010), doch bei einem Mausmodell der Neuromyelitis optica konnte jüngst mit kompetitiven, nicht pathogenen Antikörpern gegen AQP4, welche die Bindung der pathogenen Autoantikörper an AQP4 verhindern, die Entwicklung von Läsionen abgewendet werden (Tradtrantip et al. 2012). Bei Myasthenia gravis führte die sukzessive Identifikation nicotinerger Acetylcholinrezeptoren, einer muskelspezifischen Tyrosinkinase (MuSK) und zuletzt des low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP4) (Shigemoto 2007; Pevzner et al. 2012) als pathogenetisch relevante Autoantigene dazu, dass inzwischen Subgruppen dieser Erkrankung erkannt werden

können (Higuchi et al. 2011; Zhang et al. 2012). Die Autoreaktivität gegen Acetylcholinrezeptoren war die erste, die bei Myasthenia gravis entdeckt wurde (Almon et al. 1974), doch konnte durch die Identifikation neuer Autoantigene das Vorhandensein von Patienten mit Symptomen von Myasthenia gravis, aber ohne Autoantikörper gegen Acetylcholinrezeptoren erklärt werden (Evoli et al. 2003). Hier hat sich inzwischen auch gezeigt, dass die Pathomechanismen, die von Antikörpern gegen Acetylcholinrezeptoren verursacht werden, sich grundsätzlich von denen, die durch MuSK-Antikörper vermittelt werden, unterscheiden (Gomez et al. 2010). Diese können sich offensichtlich ergänzen, da das gleichzeitige Auftreten beider Autoantikörper mit einem besonders schweren Verlauf der Krankheit assoziiert ist (Nikolic et al. 2012). Auch bei rheumatoider Arthritis (Nicaise-Roland et al. 2012; Sokolove et al. 2012) oder bei der Onkologie werden die Möglichkeiten von Autoantikörpern als diagnostisches Hilfsmittel untersucht (Luo et al. 2012; O'Rourke et al. 2012). Zusätzlich zu ihrem Nutzen bei der Diagnose eines gegenwärtig vorliegenden pathologischen Zustandes können Reaktionen gegen bestimmte Antigene sogar prädiktiven Nutzen haben. Wie im Fall von Typ I Diabetes (Barker et al. 2004; Stanley et al. 2004; Lamb et al. 2009; Steck et al. 2011) deutlich wird, kann der prädiktive Nutzen von bestimmten Autoantikörpern als Biomarker darin bestehen, dass sie in manchen Fällen schon mehrere Jahre vor dem Auftreten von Krankheitssymptomen nachweisbar sind und das spätere Entstehen der Erkrankung zuverlässig anzeigen (LaGasse et al. 2002). Hierbei muss das erkannte Autoantigen nicht zwingend pathogenetisch relevant sein. Auch konnte zusätzlich bei manchen Fällen, wie beispielsweise bei Rheumatoider Arthritis (Meyer et al. 1997) oder Morbus Crohn (Sakiyama et al. 2008) die Reaktion gegen spezielle Autoantigene die Schwere eines Krankheitsverlaufes widerspiegeln oder vorhersagen. Eine weitere Hoffnung vieler Forschergruppen war es, alternativ zu systemischer pharmakologischer Immunsuppression mit ihren unerwünschten Nebenwirkungen, als therapeutischen Ansatz eine gezielte Toleranz gegenüber den angegriffenen Proteinen zu induzieren, indem man beispielsweise durch Zufuhr eines Autoantigens über Schleimhäute vermehrte Bildung regulatorischer Immunzellen anregt und so die autoimmune Reaktion dagegen abschwächt (Mowat 1999). Im Bereich der Allergieforschung werden viele Patienten inzwischen mittels sublingual verabreichten „Vakzinen“ behandelt, die eine Toleranz gegen die verwendeten Allergene induzieren (Moingeon and Mascarell 2012). Trotz vieler Erfolge bei Tiermodellen gelang aber für

Autoimmunerkrankungen im Wesentlichen noch nicht der Schritt zur klinischen Anwendung beim Patienten (Larche and Wraith 2005; Clemente-Casares et al. 2012). Als Ausnahme zeichnet sich hier möglicherweise Typ I Diabetes ab. Der Versuch, bei Patienten mit Typ I Diabetes durch orale Administration von Insulin eine Toleranz gegen dieses Autoantigen zu erzeugen, scheiterte (Chaillous et al. 2000). Auch zeigte sich in einer randomisierten Doppelblindstudie, dass bei Kindern, die aufgrund ihres HLA Genotyps und bestimmten Autoantikörpern als gefährdet für Typ I Diabetes eingestuft wurden, die nasale Administration von Insulin die Entwicklung der Krankheit weder verhindern noch verzögern konnte (Nanto-Salonen et al. 2008). Jedoch gelang bei einer Studie aus dem Jahr 2011 eine Toleranzinduktion bei Patienten mit Typ I Diabetes in einem frühen und subakuten Stadium mittels nasaler Verabreichung des Autoantigens (Furlanos et al. 2011). Zwar ließ sich im Verlauf der Studie bei metabolischen Parametern kein Unterschied bei den zwischen den Patienten, die Insulin verabreicht bekommen hatten und der Placebogruppe feststellen, allerdings war bei Patienten der Insulin-Gruppe die Aktivität der B-Zellen insgesamt verringert und die Autoantikörperantwort auf injiziertes Insulin signifikant niedriger (Furlanos et al. 2011).

Die Identifikation neuer, bisher unbekannter Autoantigene trägt dazu bei, das Wissen um die Pathomechanismen bei der ERU stetig zu vertiefen und zu vervollständigen, könnte aber auch Konsequenzen für Therapie oder Diagnose bei der ERU haben. Bei einer Erkrankung mit dieser Bedeutung für die Tiermedizin wäre auch die Identifikation prädiktiver Marker wünschenswert, um zukünftig Pferde mit einem hohen Erkrankungsrisiko vorher identifizieren zu können. Daher ist es notwendig, das Autoantigenspektrum in der ERU möglichst in seiner gesamten Breite zu kennen.

2.2.4. Bedeutung der Autoantikörperantwort bei der ERU

Zwar wurden als Schlüsselfaktoren bei der ERU autoaggressive T-Lymphozyten nachgewiesen, doch gibt es Hinweise darauf, dass auch die humorale Antwort eine Rolle in der Pathogenese spielt (Deeg et al. 2001). So befinden sich neben dem großen Anteil von T-Lymphozyten auch B-Lymphozyten unter den infiltrierenden Zellen in der uveitischen Retina (Deeg et al. 2002a). Das Vorhandensein von lymphoiden Follikeln, vor allem im Ziliarkörper in frühen Stadien der ERU, aber auch

in Iris und Choroidea in späteren Stadien, in deren Zentrum sich CD3-negative Lymphozyten (vermutlich B-Lymphozyten) befinden (Deeg et al. 2002a), könnte zudem ein Hinweis auf eine lokale, intraokuläre Antikörperproduktion sein. Die Rolle von B-Lymphozyten, deren bekannteste Funktion die Produktion von Antikörpern ist, wird auch in T-Zell-dominierten Autoimmunerkrankungen zunehmend als wichtiger Faktor wahrgenommen (DiLillo et al. 2011). So gibt es zum Beispiel beim Sjögren-Syndrom, einer systemischen Autoimmunerkrankung, von der hauptsächlich exokrine Drüsen betroffen sind, neue Erkenntnisse, die in Frage stellen, ob die Erkrankung noch als T-Zell-vermittelt eingestuft werden kann (Meijer et al. 2010). Da sich therapeutische Strategien, die auf eine Depletion von B-Zellen abzielen, bei Patienten dieser Erkrankung als bemerkenswert wirkungsvoll erwiesen (Meijer et al. 2010), wird inzwischen sogar diskutiert, ob nicht die Bedeutung der B-Lymphozyten die der T-Zellen übersteigt (Hamza et al. 2012).

Die Bindung eines Zielproteins durch einen Autoantikörper kann eine unmittelbare Beeinträchtigung physiologischer Funktionen dieses Proteins bewirken (Alard et al. 2011) und so zur Pathogenese beitragen. Neben der Frage, welches Autoantigen als Zielstruktur erkannt wird, kann aber auch der Isotyp des Autoantikörpers, der daran bindet, von Bedeutung sein. In vielen Fällen konzentrierte sich die Forschung bislang allgemein auf IgG-Antworten (Katsumata et al. 2011; Kim et al. 2011). Hier kann der Subtyp des IgG-Autoantikörpers entscheidenden Einfluss darauf haben, ob die Autoreaktivität pathogen ist oder nicht. Für die Autoaggressivität bei der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) des Menschen wurde beispielsweise nachgewiesen, dass für eine pathogene Wirkung nicht ausschlaggebend ist, ob Autoantikörper gegen das Antigen gebildet werden, sondern welcher Isotyp es ist, der gebildet wird. Bei einer DCM-Erkrankung ist dies nämlich der pro-inflammatorische Isotyp IgG3, bei gesunden Menschen dagegen finden sich IgG1 Antikörper gegen Herzproteine, die zu keiner Pathologie führen (Warraich et al. 1999; Staudt et al. 2002; Warraich et al. 2002; Staudt et al. 2005). Vom Pferd ist inzwischen bekannt, dass es sieben IgG-Isotypen besitzt (Wagner 2006), deren genaue Funktionen bisher aber nur zum Teil bekannt sind (Lewis et al. 2008). So können IgG1, IgG3, IgG4, IgG5 und IgG7 einen respiratorischen Burst peripherer Blutleukozyten auslösen, IgG2 und IgG6 jedoch nicht, was darauf hinweist, dass nur die erstgenannte Gruppe mit Fc-Rezeptoren der Effektorzellen interagieren kann (Lewis et al. 2008). Auch waren nur IgG1, IgG3, IgG4 und IgG7 in der Lage, Komplement C1q zu binden und so über den klassischen

Weg die Komplementkaskade zu aktivieren, hier war IgG3 der potenteste Aktivator (Lewis et al. 2008). Ein Mangel an spezifischen Reagenzien erschwert es derzeit noch, IgG-Isotyp-spezifische Immunantworten bei der ERU nachzuweisen.

Einer IgG-Antwort gegen ein Antigen geht jedoch immer eine anfängliche IgM-Antwort voraus (Schroeder and Cavacini 2010; Xu et al. 2012). Die ERU ist eine Erkrankung, die von chronisch wiederkehrenden Schüben autoimmuner Angriffe gekennzeichnet ist, die mit dem Mechanismus des Epitop-Spreadings auf intra- und intermolekularer Ebene erklärt werden können (Deeg et al. 2006a), welcher auch bei anderen Autoimmunerkrankungen beobachtet wurde (Kidd et al. 2008; Sokolove et al. 2012). Hierbei kommt es unter anderem durch die Zerstörung des Zielgewebes zu Veränderungen im Antigenspektrum und in der Folge zur Entstehung neuer Autoreaktivitäten, die zuvor nicht vorhanden waren (Deeg et al. 2006a). Dies wurde sowohl bei spontan erkrankten Pferden (Deeg et al. 2006b), als auch bei Pferden mit experimentell induzierter Uveitis (Deeg et al. 2006a) beobachtet.

Ein Hinweis auf die mögliche Beteiligung von IgM-Immunreaktionen bei der ERU ergab sich durch die Hochregulation von IgM im Serum von spontan an ERU erkrankten Pferde im Vergleich zum Serum gesunder Tiere (Zipplies et al. 2010a). Durch die Identifikation von Zielstrukturen einer IgM-Antwort könnte wiederum früh ein Hinweis auf neu entstehende Autoreaktivitäten gewonnen werden.

2.2.5. Der Glaskörper als Probenmaterial bei der ERU

Der Glaskörper (syn. Vitreus) steht im Augeninneren in direktem Kontakt mit der Retina (Ehrenhofer et al. 2002), was ihn zu einem hervorragenden Probenmaterial macht, um im Auge lokalisierte Pathomechanismen bei der ERU zu studieren (Deeg et al. 2007a). Die Pars-plana-Vitrektomie, ein chirurgischer Eingriff, bei dem der Glaskörper entfernt und das Augeninnere mit einer Ersatzflüssigkeit gefüllt wird und dessen Anwendung beim Pferd erstmals von Werry und Gerhards beschrieben wurde (Werry and Gerhards 1992), führte in vielen Fällen dazu, dass das verbliebene Sehvermögen betroffener Tiere stabil blieb und eine Wiederkehr der akuten Schübe unterblieb (Fruhauf et al. 1998). Der positive Einfluss, den dieser Eingriff auf den Krankheitsverlauf der ERU hatte, war ein erster Hinweis darauf, dass im Glaskörper für die Pathogenese bedeutsame Prozesse ablaufen (Fruhauf et al. 1998). Auch der in vielen Fällen erfolgreiche therapeutische Einsatz von intravitrealen Ciclosporin A

freisetzenden Implantaten (Gilger et al. 2001), sprach für diese Annahme. Diese Hypothese konnte in den Folgejahren bestätigt werden, indem auf proteomischer Ebene gravierende Unterschiede zwischen Glaskörperproben gesunder und an ERU erkrankter Tiere nachgewiesen wurden (Deeg et al. 2007a). Die differenzielle Regulation von Proteinen im ERU-Glaskörper stand dabei unter anderem in funktionellem Zusammenhang mit einer großen Vielfalt an biologischen Signalwegen, darunter Entzündungsprozessen, Immunantwort, Angiogenese, (Deeg et al. 2007a), der Re-Modellierung der extrazellulären Matrix, verminderter Neuroprotektion (Deeg et al. 2011; Hofmaier et al. 2011), Koagulation, dem Komplementsystem sowie der Funktion retinaler Müller-Gliazellen (Hauck et al. 2012).

Auch konnten in 72% der getesteten ERU Glaskörper IgG-Antikörper gegen IRBP und S-Antigen nachgewiesen werden, wohingegen Glaskörperproben augengesunder Pferde in keinem Fall IgG enthielten (Deeg et al. 2001). Der Glaskörper ist also ein hochinteressantes, und wie die genannten Studien in der Vergangenheit gezeigt haben, vielseitig einsetzbares Probenmaterial, das reich an Informationen ist. So können dort nicht nur differenziell regulierte Proteine im Zielorgan nachgewiesen werden (Hauck et al. 2012), sondern auch spezifische intraokuläre Immunreaktionen (Deeg et al. 2001). Die routinemäßig zu Therapie Zwecken an der Pferdeklinik der LMU München angewandte Pars-plana-Vitrektomie bietet für die Forschung an ERU zudem den einmaligen Vorteil, dass eine große Anzahl von frischen intraokulären Proben von Patienten unterschiedlichster Krankheitsstadien zur Verfügung steht.

3 PUBLIKATION

Titel

„Vitreale IgM Autoantikörper Target Neurofilament Medium in einem Spontanen Modell der Autoimmunen Uveitis“

Autoren

Margarete E. Swadzba, Sieglinde Hirmer, Barbara Amann, Stefanie M. Hauck und Cornelia A. Deeg

Journal

Investigative Ophthalmology & Visual Science

Status

Publiziert.

Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012 Jan 25;53(1):294-300. doi: 10.1167/iovs.11-8734.

Print 2012 Jan.

<http://www.iovs.org/content/53/1/294.long>

Immunology and Microbiology

Vitreous IgM Autoantibodies Target Neurofilament Medium in a Spontaneous Model of Autoimmune Uveitis

Margarete E. Swadzba,¹ Sieglinde Hirmer,¹ Barbara Amann,¹ Stefanie M. Hauck,² and Cornelia A. Deeg¹

PURPOSE. Although the presence of IgG autoantibodies in the vitreous of spontaneous cases of equine recurrent uveitis (ERU) has been demonstrated, the potential role of IgM reactivities during ERU pathogenesis remains unexplored. The purpose of this study was to examine the presence of IgM autoantibodies in vitreous specimens of ERU-affected horses and to test their binding specificity to intraocularly expressed proteins.

METHODS. To test IgM autoantibody responses to retinal tissue, vitreous samples of eye-healthy controls and ERU patients were analyzed via two-dimensional Western blot analysis with equine retinal tissue as an antigen source. A candidate protein, the peptide neurofilament medium (NF-M), was identified via mass spectrometry and validated via enzyme-linked immunosorbent assay. Immunohistochemistry for NF-M expression was performed on healthy and ERU-affected retinal sections.

RESULTS. Whereas autoreactivity was never detected in the healthy vitreous samples, NF-M was specifically targeted by vitreous IgM autoantibodies in 44% of the ERU cases. Vitreous anti-NF-M IgG was detected in only 8% of the ERU samples, pointing to a persistent IgM response. In healthy horse retina, NF-M was located in the retinal ganglion cells and their processes, with additional staining in the outer plexiform layer. NF-M expression in ERU-affected retinas decreased considerably, and the remaining expression was limited to the nerve fiber layer.

CONCLUSIONS. Intraocular anti NF-M IgM autoantibodies occur with high prevalence in vitreous of spontaneous autoimmune uveitis cases. The IgM dominated response may indicate a thymus-independent response to NF-M and merits further investigation in ERU, as well as in its human counterpart, autoimmune uveitis. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53:294–300) DOI:10.1167/iov.11-8734

Equine recurrent uveitis (ERU) is a highly prevalent autoimmune disease in horses. Characterized by remitting-relapsing episodes of intraocular inflammation and closely resembling human autoimmune uveitis (AU), ERU is well established as a spontaneous model of human uveitis.¹ We already know that during the onset of disease, the eye's former immune privilege² is abolished, and the blood-retina barrier breaks down, allowing autoaggressive T-cells to invade the retinal tissue.^{3,4} Retinal proteins such as S-antigen (S-Ag), interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP), and cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP), are targets in ERU that have been shown to induce ERU-like disease in horses.^{5–7} Because of its proximity to the protein pool of further potential targets among retinal proteins and its good availability, vitreous humor is a highly promising source specimen to further explore and elucidate the pathogenesis of ERU.⁸

One of the main factors contributing to ERU pathogenesis is the leaky blood-retinal barrier,⁹ which allows autoreactive T cells to invade the retina. T cells are known to be key players in ERU,¹⁰ but other cells, among them B cells, are also found in retinal tissue in ERU.⁹ The best known effector function of B cells is antibody production and in several autoimmune diseases, autoantibodies are known to directly contribute to pathogenesis.¹¹ In ERU, the presence of IgG antibodies against S-Ag and IRBP was previously observed in 72% of ERU-affected vitreous samples,¹⁰ whereas, in contrast, vitreous specimens from eye-healthy horses contained no IgG at all.¹⁰ The appearance of IgG antibodies is usually preceded by an initial IgM response.¹² This aspect is of special importance, since it is known that, in ERU, epitope-spreading takes place, leading to alterations in the antigen spectrum and subsequent new autoreactivity.¹³ Since IgM may point to newly emerging autoreactivity in the context of epitope-spreading and its upregulation in serum of ERU cases additionally caught our attention in a previous study,¹⁴ the purpose of this study was to determine whether intraocular IgM autoantibodies directed to retinal proteins are present in healthy and ERU-affected vitreous.

METHODS

Samples

Vitreous samples of ERU cases were obtained during therapeutic pars plana vitrectomy from horses diagnosed with ERU¹⁰ and treated at the Equine Clinic of LMU Munich. ERU-affected eyes providing ERU samples for retina sections used in immunohistochemistry were also from horses treated for ERU at the clinic. Control vitreous samples and healthy retinal specimens for proteome preparation and immunohistochemistry were derived from eyes obtained at a local abattoir. Eyes were considered normal based on the diagnosis of the veterinarian present at the abattoir, medical histories of the horses as provided by their owners, and preliminary histologic analysis. Vitreous samples

From the ¹Institute of Animal Physiology, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, LMU Munich, München, Germany; and the ²Department of Protein Sciences, Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health (GmbH), Neuherberg, Germany.

Supported by Grant DE 719/2-2 from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG).

Submitted for publication October 4, 2011; revised November 18, 2011; accepted December 11, 2011.

Disclosure: M.E. Swadzba, None; S. Hirmer, None; B. Amann, None; S.M. Hauck, None; C.A. Deeg, None

Corresponding author: Cornelia A. Deeg, Institute of Animal Physiology, Department for Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, LMU Munich, Veterinärstrasse 13, 80539 München, Germany; deeg@tiph.vetmed.uni-muenchen.de.

were stabilized with protease inhibitor (Roche, Mannheim, Germany) and stored at -20°C until used. Eyes used for healthy and ERU-affected retinal sections were prepared according to a standardized protocol.¹⁵ Retina specimens were prepared as previously described.⁴ All horses were treated according to the ethical principals and guidelines for scientific experiments on animals according to the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. No experimental animals were used in the study.

A total of 37 unique control vitreous samples and 95 unique ERU-affected vitreous samples were analyzed. Western blot analysis was performed using 25 different control samples and 50 different ERU-affected samples. For the ELISA assay, 20 different control vitreous samples and 72 different ERU-affected samples were used. Immunohistochemical analysis was performed using 12 healthy retinal sections derived from 10 eyes and 9 retinal sections derived from 9 eyes affected by ERU.

SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Retinas were solubilized in 2DE lysis buffer (9 M urea, 2 M thiourea, 1% DTE, 4% CHAPS, and 2.5 mM each of EGTA and EDTA), and protein content was quantified with the Bradford assay (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany). For one-dimensional gel electrophoresis, retinal protein (40 μg per gel) was resolved by 10% SDS-PAGE. For two-dimensional (2D) gel electrophoresis, dry strips (Immobiline, pH 3–11 NL, 11 cm; GE Healthcare, Freiburg, Germany) were rehydrated overnight in lysis buffer containing 100 μg retina, additional 1% ampholyte carriers (Pharmalyte, pH 3–11; GE Healthcare), and 0.5% bromophenol blue. Isoelectric focusing (IEF) was performed (Multiphor; GE Healthcare) at 14 kV/h at 20°C , followed by separation on SDS gels (10%) at a constant 45 V per gel at 4°C . The gels were used for Western blot analysis or as master gels for candidate protein detection.

Western Blot Analysis

For Western blot analysis, gels resulting from SDS-PAGE were blotted semidry on PVDF membranes (GE Healthcare). After nonspecific binding was blocked with 1% polyvinylpyrrolidone in PBS-T (PBS containing 0.05% Tween 20) for 1 hour at room temperature, blots were incubated with vitreous samples as a primary antibody source (controls or ERU-affected, dilution 1:100) overnight at 4°C . The blots were washed subsequently and incubated with secondary antibody for 1 hour at room temperature (goat anti-horse-IgM POD, dilution 1:10,000; AbD Serotec, Düsseldorf, Germany). Signals were detected via enhanced chemoluminescence on x-ray film (Christiansen, Planegg, Germany).

Mass Spectrometry

Selected spots from 2D analysis were excised, destained, and processed by proteolysis with trypsin, as described before,⁴ and analyzed by MALDI-TOF peptide mass fingerprinting and MS/MS on a MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer (4700 Proteomics Analyzer; Applied Biosystems, Inc. [ABI], Darmstadt, Germany). For positive-ion reflector mode spectra, 2500 laser shots were averaged and processed with external calibration. PMF spectra were not smoothed, and background was not subtracted. Monoisotopic peak masses were automatically determined within the mass range 800 to 4000 kDa with a signal-to-noise ratio minimum set to 5 and the local noise window width at m/z 200. Up to seven of the most intense ion signals with signal-to-noise ratio above 30 were selected as precursors for MS/MS acquisition excluding common trypsin autolysis peaks and matrix ion signals. In MS/MS positive-ion mode, 4000 spectra were averaged with 1 kV collision energy, collision gas air at a pressure of 1.6×10^6 torr and default calibration. Monoisotopic peak masses were automatically determined with a signal-to-noise ratio minimum set to 10 and the local noise window width at m/z 200. Combined PMF and MS/MS queries were performed using the MASCOT database search engine (ver. 1.9; Matrix Science Ltd., London, UK) embedded in proteomics application software (GPS-Explorer Software; ABI) on the Ensemble horse database

(EquCab2 assembly: 22,641 sequences; 12,722,273 residues; downloaded from the Ensembl public database, <http://www.ensembl.org/index.html>) with the following parameter settings: 65-ppm mass accuracy, 0.8-Da fragment mass tolerances, trypsin cleavage, with one missed cleavage allowed. Carbamidomethylation was set as a fixed modification, and oxidation of methionines and deamination of asparagine and glutamine were allowed as variable modification. A protein was regarded as identified if the probability-based MOWSE score was significant (>70 ; $P < 0.05$), if the matched peptide masses were abundant in the spectrum and if the theoretical masses of the significant hit fit the experimentally observed values.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Polystyrene 96-well flat-bottomed plates (Nunc Maxisorp; Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germany) were coated with native bovine neurofilament medium (NF-M) polypeptide (Hoelzel Biotech, Cologne, Germany) or porcine neurofilament light (NF-L, MW 68; Biomol, Hamburg, Germany). For coating, lyophilized protein was reconstituted according to the manufacturer's instructions and diluted at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in NaHCO_3 buffer (pH 9.6). Each well was incubated with 100 μL of this dilution overnight at 4°C . Plates were blocked with 200 μL per well 0.5% gelatin at 37°C for 1 hour to prevent nonspecific binding. Vitreous samples as primary antibody source were diluted 1:100 in PBS-T, and the wells were incubated at 37°C for 1 hour (100 $\mu\text{L}/\text{well}$) and washed with PBS-T (three times, 300 $\mu\text{L}/\text{well}$). For both the IgM and IgG assays, wells were incubated with the respective secondary antibody, 50 $\mu\text{L}/\text{well}$ for 1 hour at 37°C . We used either goat anti-horse-IgM POD antibody (dilution 1:100,000; AbD Serotec) or goat anti-horse-IgG Fc POD antibody (dilution 1:100,000; Biozol, Eching, Germany). To enable later correction for blank values, each plate contained four wells in which primary antibody incubation was omitted. Using tetramethylbenzidine (Sigma-Aldrich) as a substrate, we measured optical density (OD) at 450 nm with a microplate reader after stopping the reaction with 1 M sulfuric acid (50 $\mu\text{L}/\text{well}$). The cutoff was set at a fivefold increased SD above the average OD of vitreous samples from healthy horses. The frequency of positive reactions in control samples and ERU samples were compared by using Fisher's exact two-tailed test; differences were significant at $P < 0.05$ (GraphPad Prism 5.04 software; Statcon, Wittenhausen, Germany).

Immunohistochemistry

Posterior eyecups were fixed in Bouin's solution (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany), as previously described.¹⁶ The tissue blocks¹⁵ obtained were sectioned (8 μm) and subsequently mounted on coated slides (Superfrost; Menzel, Braunschweig, Germany). Heat antigen retrieval was performed at 99°C for 15 minutes in 0.1 M EDTA-NaOH buffer (pH 8.0). To prevent nonspecific antibody binding, sections were blocked with 1% BSA in TBS-T containing 5% goat serum for 40 minutes at RT before incubation with monoclonal mouse anti-160-kDa neurofilament medium antibody (dilution 1:100; Biozol), followed by goat anti-mouse-IgG-Fc secondary antibody labeled with horseradish peroxidase (dilution 1:200; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Antibody binding was visualized using a peroxidase substrate kit (Vector-VIP SK-4600; Linaris, Wertheim, Germany), resulting in a purple stain. Cell nuclei were counterstained with Mayer's hematoxylin (Sigma-Aldrich). The sections were then fixed via successive immersion steps in increasing alcohol concentrations and covered with glass coverslips (Fluka Eukitt mounting medium; Sigma-Aldrich). For comparison, healthy ($n = 12$) and ERU-affected retinas ($n = 9$) were examined via tissue microarray. This technique provided the advantage of high comparability between the staining of retinal sections, as all tissue specimens examined were mounted and stained on the same slide (Alphamatrix; Beecher, Rödermark, Germany).¹⁷ Images were recorded with a scanner (Mirax Scan; Carl Zeiss Meditec, Göttingen, Germany) and analyzed (Panoramic Viewer 1.15.00.53 software; Intas, Göttingen, Germany).

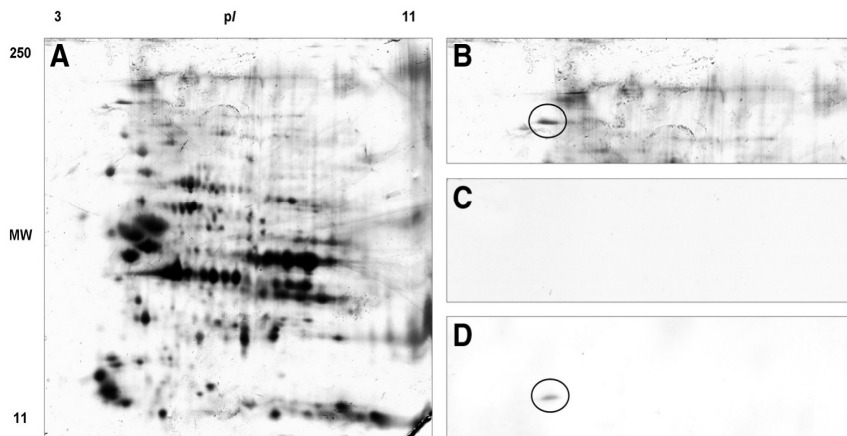


FIGURE 1. Autoreactivity of vitreal IgM antibodies to the retinal proteome. (A) 2D gel displaying the map of the equine retinal proteome, silver stained. (B) Zoom-in view of (A), showing the area of the 2D gel containing proteins with MW of ~80 to 250 and a pI of ~3 to 9. Circle: spot identified as NF-M by tandem mass spectrometry. (C) Western blot of a 2D-gel incubated with control vitreous sample showing no IgM reaction. (D) Exemplary Western blot of a 2D-gel incubated with vitreous sample from ERU-affected horse. Circle: reaction to NF-M appearing repeatedly among ERU samples.

RESULTS

IgM Autoantibodies in ERU-Affected Vitreous Samples Target NF-M

To determine the presence and possible binding targets of IgM autoantibodies in vitreous samples, we used an antigen source consisting of equine retinal proteins (Figs. 1A, 1B) subjected to 2D PAGE and subsequent Western blot analysis. Whereas control vitreous samples were consistently negative for IgM antibodies (Fig. 1C), ERU-affected specimens showed a variable binding pattern, ranging from no signal at all to a multitude of proteins in a single sample. One protein spot was particularly notable, as reactions to it were repeatedly detected in vitreous samples of ERU cases (Fig. 1D). It was located at a rather high molecular mass (~100) and a rather acidic pI of 4 to 5 on 2D blots. Alignment to a silver-stained 2D master gel of retinal proteome (Fig. 1A) and subsequent unambiguous identification with tandem mass spectrometry revealed NF-M polypeptide (MW 95, pI 4.84, protein score 264; Ensembl database accession number: ENSECAP00000019857) as the targeted protein (Fig. 1B).

Vitreous IgM Response to NF-M Outweighs the IgG Response

To verify our findings from the experimental set of 2D Western blots, we used an indirect ELISA, enabling us not only to confirm that NF-M was the actual targeted protein, but also to test whether the observed high prevalence of reactions would hold true in a large-scale test setup. First, we examined the frequency of vitreal IgM reactions toward NF-M in controls and ERU samples. All controls tested were negative, whereas in 44% of ERU diseased samples an IgM reaction toward NF-M was detected (Fig. 2). Since 44% of ERU cases had intraocular NF-M-specific IgM autoantibodies, we were next interested to determine whether these IgM responses were followed by intraocular IgG responses. Therefore, we tested the IgG reactivity toward NF-M in the same vitreous samples as used for the IgM assay. All control samples were negative again, whereas 8% of uveitic samples were anti-NF-M/IgG positive (Fig. 2). Of note, compared with the large proportion of intraocular IgM-positive ERU cases (44%), the number of IgG reactions (8%) was strikingly low (Fig. 2). Half of these IgG-positive samples were IgM/IgG double positive, and the other half had exclusively IgG antibodies. ELISA results showed that IgM in ERU-affected vitreous samples specifically target NF-M with high frequency. Since NF-M shares structural similarities with NF-L that could result in antibody cross-reactivity,^{18,19} we controlled the specificity of autoantibodies to NF-M specificity by testing

the same vitreous specimen in ELISAs coated with the NF-L subunit. Again, none of the control samples showed any reactivity as well as none of the tested ERU samples, thus confirming that NF-M autoantibodies did not bind to NF-L.

Reduced Expression of NF-M in ERU-Affected Retina

As ELISAs showed NF-M to be such a frequent target for vitreal IgM autoantibodies in ERU-affected samples, we were very interested in exploring its expression pattern in the target tissue retina. Alterations in expression strength or location may give us valuable clues concerning the role of NF-M in ERU pathophysiology and also indicate which cells may be most affected by it. Our immunohistochemical analysis of NF-M expression in equine retina showed the retinal ganglion cell (RGC) layer and nerve fiber layer of healthy retinal tissue to be the sites with the strongest and most extensive signal, whereas moderate expressions in the inner plexiform layer (IPL) and outer plexiform layer (OPL) were also observed (Fig. 3A). Notably, not all RGC somata stained for NF-M. Most of the unstained cells appeared to be small RGCs.¹⁵ The scattered expression foci in the IPL showed signals of varying intensity, with an overall signal intensity that appeared to be slightly below that in the nerve fiber layer. We can report that NF-M distribution in healthy equine retina resembles that in porcine retina, especially with expression in the RGCs, and that, in

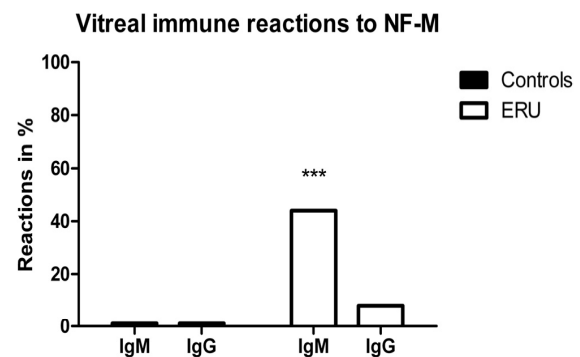


FIGURE 2. Reactivity toward NF-M in indirect ELISA, comparing control and ERU-affected vitreous samples. The percentage of IgM and IgG reactivities in all tested vitreous samples is presented. No reactions were observed in the control samples. Reactions were observed in the ERU-affected samples. Of all the ERU samples, 44% tested IgM positive and 8% tested IgG positive. In the ERU samples, IgM reactions were observed much more frequently than IgG reactions.

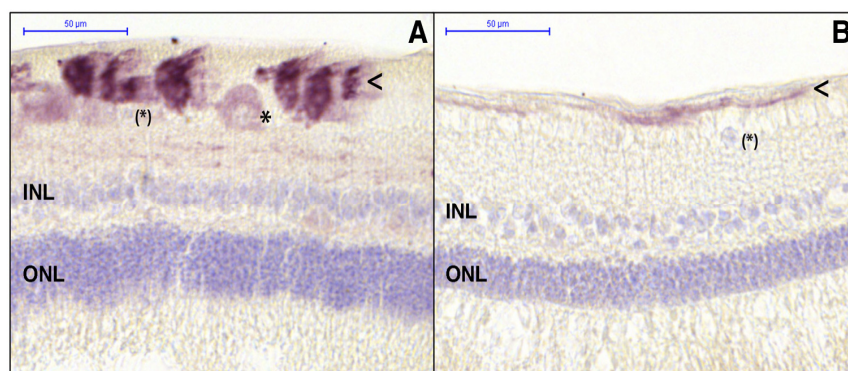


FIGURE 3. Changes in NF-M expression (purple) in ERU-affected retina. Both sections represent the central retina. (A) NF-M expression in a healthy retina with the predominant signal in the nerve fiber layer (open arrowhead) and most RGCs (*). Note the unstained RGC (* in brackets). Additional staining is visible in the IPL fiber structures and OPL cells and fibers. Cell nuclei (blue) were stained with hematoxylin. (B) Representative image of an ERU-affected retina with absent NF-M signal in the OPL and IPL and the negative RGC (* in brackets). Residual NF-M expression occurred only in the nerve fiber layer (open arrowhead).

addition, NF-M is present in the equine OPL, as it is in that of the pig.²⁰ However, in retinal tissue affected by ERU (Fig. 3B), NF-M expression was strongly decreased in all samples, the extreme being a complete loss of NF-M staining. The only exception was one case without detectable changes in NF-M expression. A consistent feature in ERU specimens was the absence of NF-M staining in IPL and OPL. Also, NF-M positive RGC somata were detected less frequently than in healthy retinas. NF-M expression in the nerve fiber layer was still detectable in ERU-affected sections, except for the aforementioned NF-M-negative specimen. Intensity and distribution of the NF-M signal in ERU-affected nerve fiber layers were variable, however. In one sample, only overall staining intensity in the nerve fiber layer was reduced, with no changes in distribution pattern, whereas in several others, we observed a reduction in both the distribution pattern to isolated residual foci and a reduction of signal intensity to moderate to low.

DISCUSSION

ERU is currently the only spontaneous animal model for human AU,⁸ a disease characterized by remitting-relapsing inflammation of the inner eye, ultimately leading to blindness, in which pathogenesis and origin are not entirely clarified to date.^{21,22} Besides the great similarities in clinical appearance and the spontaneous occurrence of both diseases, the most impressive proof of the high transferability and extremely valuable contribution of ERU to AU research was the demonstration that CRLBP, an autoantigen detected in the ERU model,⁷ is a highly prevalent autoantibody target in AU, as well.³ Research in the field of autoimmunity and studies investigating autoreactivities are mostly focusing on serum antibody profiling, an all-purpose source material available in relatively large amounts that can be obtained in an ethical way, even repeatedly, from most animals, human patients, and control subjects alike. However, antibody profiling that is focused on source material close to the target tissue has been shown to yield highly interesting results in other autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, in which synovial autoantibodies were investigated.²³ In the field of ophthalmology, vitreous meets the criteria for source material very well, as it is in direct contact with the retina. The vitreous body is a structure that greatly merits further investigation in AU and ERU, as in addition to its immediate proximity to the target tissue, it shows unique immunologic properties.⁸ A great advantage of the horse

model ERU in this approach is that, via vitrectomy, intraocular autoantibodies are available for research in ample amounts and almost immediately after sampling. We were able to gain information about differentially expressed proteins in healthy and ERU-affected vitreous in a previous study, discovering changes in the matrix metalloproteinase pathway^{8,24} in ERU that were accompanied by a rise in vitreal IgM content. Another study examining intraocular samples in ERU showed that vitreal IgG content is increased in ERU samples²⁴ and that autoreactive immune cells and IgG autoantibodies were present in ERU-affected vitreous specimens, but not in vitreous samples from healthy eyes.¹⁰ Yet, IgG antibodies are probably not the only type involved in autoimmune processes occurring in ERU. Serum IgM is upregulated in ERU,¹⁴ which probably points to an important role for IgM autoantibodies in ERU, as well. Thus, the purpose of this study was to examine whether intraocular IgM autoreactivity is detectable, using vitreous as autoantibody source material. Western blot analysis on a preliminary test sample set showed that IgM reactions were very frequent in ERU-affected vitreous samples, showing a great diversity in their binding patterns. Among this variety of reactions, one protein spot was bound repeatedly and was subsequently identified as NF-M (Fig. 1B). Moreover, the identification of NF-M as intraocular IgM autoantibody target for nearly every second ERU-affected case, supports the possible role of IgM autoantibodies in ERU. In a large set of samples, ELISAs verified that NF-M was indeed the protein targeted by intraocular IgM with a high prevalence (44%) in ERU. In addition, we observed that compared to the high prevalence of IgM reactions, the prevalence of vitreal IgG response toward NF-M is almost negligible. ERU-affected vitreous samples used in these assays represented horses in a variety of different disease stages, and the number of positive IgM reactions among them is so high that the discrepancy between the scarce IgG-positive and the frequent IgM-positive reactions is not likely to be a transient occurrence in the course of disease. An IgM response is usually seen as the first line of defense, indicating an acute response to an antigen.¹² One of the most famous events in immunology is the switch of antibody isotype that is often observed if antigen exposure continues or reoccurs—that is, the initial IgM response is switched to an IgG response with enhanced antibody affinity.^{12,25} However, the intraocular ERU IgM antibodies analyzed in this study were obtained during vitrectomy, which is a therapeutic procedure undertaken in clinical quiescent state, making our observation of an IgM-dominated response even

more remarkable. Evidence thus strongly points to an IgM response toward NF-M that persists over an uncommonly long period.

IgM is a very potent activator of the complement system,^{12,26} which is known to contribute to tissue destruction and promote inflammation in AU^{27,28} and was also shown to be involved in ERU.^{14,29} Via complement activation, the presence of an IgM response toward NF-M may aggravate the process of intraocular inflammation as a whole and thus cause damage that impacts ocular structures and cell populations beyond those that express NF-M.

Immunohistochemistry revealed that in healthy equine retina, the strongest signals were elicited in the nerve fiber layer followed by the NF-M signals in the RGC layer, which showed a homogeneous distribution in stained cell bodies (Fig. 3A). Signals in the IPL were the least intense by comparison. As the equine nerve fiber layer contains mostly RGC axons,¹⁵ we can conclude that in equine retina, RGC axons most probably show a somewhat stronger expression of NF-M than the soma and RGC dendrites. Interestingly, we found several RGC bodies that did not stain for NF-M, most of them were small RGCs.¹⁵ Equine RGCs are known to possess processes that extend into the IPL,¹⁵ which clearly stain for NF-M (Fig. 3A) and are probably the NF-M-positive structures observed here in the IPL. However, since processes of bipolar cells or amacrine cells are also known to spread into the equine IPL¹⁵ and these cells have been shown to be able to express NF proteins in other mammalian species,^{30–32} we cannot exclude them as a source of the observed NF-M staining in the IPL. The NF-M positive fiber structures and cell bodies we detected in the OPL are most likely horizontal cells. Our findings in equine retina place NF-M distribution in the horse very close to that in the pig, which is an established model organism in human glaucoma research.^{20,33–35} In the porcine retina, NF-M is also predominantly expressed in RGC axons, dendrites, and cell bodies, with smaller RGC somata staining less frequently. The NF-M signal in the OPL that was also detected in the pig has been attributed to horizontal cells.²⁰

Compared to our findings in healthy retinal tissue, NF-M expression in ERU-affected retinal tissues decreased in 89% of examined cases. A common observation was the vanishing of NF-M signal in the OPL and IPL. Although the exact significance of RGCs and their neurofilaments in AU remains to be clarified, an involvement of these two structures in glaucoma pathogenesis has been demonstrated in the past in the pig model.^{33,36} There, the NF-M signal in immunohistochemical analysis decreased in optic nerve head sections of eyes subjected to elevated intraocular pressure and in retina sections in a focal retinal ischemia experiment, as shown in the pig model.^{33,34} Interestingly, the decrease in neurofilament content in RGCs can be detected early, before alterations in axonal transport occur,^{34,35} which can lead to cell death by apoptosis.³⁷ Thus, the decrease in NF content in RGCs has been proposed as an early marker or warning sign of impending axonal damage.^{33,34} With respect to the decrease in NF-M content that we observed in equine retina tissue affected by ERU, from our point of view, there are two mechanisms that could be responsible for this finding. The first possibility features RGCs as the central factor. Damaged RGCs may downregulate NF-M expression, as observed in porcine glaucoma models,^{33–35} but we can also hypothesize that in ERU, damaged RGCs or their axons release NF-M fragments into the adjacent fluid compartment, the vitreous body, similar to the way the heavy neurofilament subunit NF-H is released into the vitreous after retinal degeneration in humans.³⁸ These released fragments may in turn expose additional antigen material to invading immune cells, keeping the autoimmune attack going. The second possibility is that NF-M is directly destroyed in the wake of the autoimmune attack

directed toward it. Cells expressing NF-M may be damaged or destroyed, as well, preventing a reconstitution of former expression levels and sites. These two mechanisms do not exclude each other and can occur concurrently to some degree. This open question could be solved, for example, by further investigation of the role of RGCs in AU or by determining NF content in ERU-affected vitreous in future experiments. However, as we do know that NF-M is a target for vitreal IgM autoantibodies, downregulation of expression is not likely to be the only factor that contributes to its decrease in the retinal tissue in ERU.

There is a surprising discrepancy in the IgM and IgG NF-M responses (Fig. 2), strongly arguing that there was no IgM/IgG switch. Persistent IgM responses can occur by B-cell activation through so-called thymus-independent (TI) antigens.³⁹ Antigens belonging to the TI type 2 (TI-2) category can directly stimulate mature B cells, by cross-linking several of their IgM receptors.⁴⁰ TI-2 antigens are a heterogeneous group, but share some common characteristics, including high molecular mass and repetitive epitope structures, the prototype being polysaccharide antigens or bacterial flagella.^{39,40} Considering its structural properties, NF-M as an antigen may meet the criteria for TI-2 activation. NF-M belongs to the group of intermediate filaments and is a subunit of the NF triplet, an essential part of the neuronal cytoskeleton that is composed of a heavy (NF-H), a light (NF-L), and a middle (NF-M) weight subunit,⁴¹ with α -internexin as a putative fourth element.⁴² Possessing posttranslational modifications, including glycosylations,^{43,44} featuring a repetitive motif in its amino acid sequence,⁴⁴ and assembling to form polymeric repetitive filament structures,⁴¹ NF-M may be fit to elicit a TI-2 response. Although it is the NF-L subunit, that has been described as a target for serum autoantibodies in glaucoma patients^{45–47} and the neurofilament triplet has been shown to occasionally induce antibodies that cross-react among the subunits,^{48,49} we confirmed by ELISA that vitreal IgM autoantibodies specifically target NF-M and do not react with NF-L. A TI-2-like activation of B cells by NF-M may thus explain the dominance, as well as the prolonged persistence, of IgM in the autoimmune response toward NF-M. The unique immunoregulatory microenvironment in the eye⁵⁰ may in some way influence B cells or plasma cells, as well, and further influence the response toward IgM domination, instead of switching to an IgG response. In addition, as changes in NF-M expression probably occur in ERU-affected retinal specimens (Fig. 3B), existing posttranslational modifications may also be altered and trigger or perpetuate the autoimmune attack.⁵¹

CONCLUSIONS

This study demonstrated that in ERU, intraocular IgM autoantibodies occur and, moreover, that they can specifically target retinal self proteins. The identification of NF-M as an autoantibody target and its subsequent demise in ERU-affected retina point to a possible involvement of RGCs in AU, as this cell population is the main source of NF-M in the healthy equine retina. The prevalence of NF-M reactive vitreal IgM autoantibodies is high, and therefore in our opinion the roles of both NF-M and vitreal IgM in the pathology of ERU and AU absolutely merit further investigation.

Acknowledgments

The authors thank Sandra Rauser and Axel Walch for access and support with the tissue microarrayer and the slide scanner and Hanna Zipplies and Christina Eberhardt for critical discussions and support with the use of 2DE.

References

- Deeg CA, Hauck SM, Amann B, et al. Equine recurrent uveitis—a spontaneous horse model of uveitis. *Ophthalmic Res.* 2008;40:151–153.
- Caspi RR. A look at autoimmunity and inflammation in the eye. *J Clin Invest.* 2010;120:3073–3083.
- Deeg CA, Raith AJ, Amann B, et al. CRALBP is a highly prevalent autoantigen for human autoimmune uveitis. *Clin Dev Immunol.* 2007;2007:39245.
- Hauck SM, Schoeffmann S, Amann B, et al. Retinal Mueller glial cells trigger the hallmark inflammatory process in autoimmune uveitis. *J Proteome Res.* 2007;6:2121–2131.
- Deeg CA, Thurau SR, Gerhards H, Ehrenhofer M, Wildner G, Kaspers B. Uveitis in horses induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein is similar to the spontaneous disease. *Eur J Immunol.* 2002;32:2598–2606.
- Deeg CA, Reese S, Gerhards H, Wildner G, Kaspers B. The uveitogenic potential of retinal S-antigen in horses. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:2286–2292.
- Deeg CA, Pompetzki D, Raith AJ, et al. Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis. *Mol Cell Proteomics.* 2006;5:1462–1470.
- Hofmaier F, Hauck SM, Amann B, Degroote RL, Deeg CA. Changes in matrix metalloproteinase network in a spontaneous autoimmune uveitis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:2314–2320.
- Deeg CA, Ehrenhofer M, Thurau SR, Reese S, Wildner G, Kaspers B. Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses. *Exp Eye Res.* 2002;75:127–133.
- Deeg CA, Kaspers B, Gerhards H, Thurau SR, Wollanke B, Wildner G. Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:393–398.
- DiLillo DJ, Horikawa M, Tedder TF. B-lymphocyte effector functions in health and disease. *Immunol Res.* 2011;49:281–292.
- Schroeder HW Jr, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:S41–S52.
- Deeg CA, Amann B, Raith AJ, Kaspers B. Inter- and intramolecular epitope spreading in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:652–656.
- Zipplies JK, Hauck SM, Schoeffmann S, et al. Kininogen in autoimmune uveitis: decrease in peripheral blood stream versus increase in target tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:375–382.
- Ehrenhofer MC, Deeg CA, Reese S, Liebich HG, Stangassinger M, Kaspers B. Normal structure and age-related changes of the equine retina. *Vet Ophthalmol.* 2002;5:39–47.
- Eberhardt C, Amann B, Feuchtinger A, Hauck SM, Deeg CA. Differential expression of inwardly rectifying K⁺ channels and aquaporins 4 and 5 in autoimmune uveitis indicates misbalance in Muller glial cell-dependent ion and water homeostasis. *Glia.* 2011;59:697–707.
- Packeisen J, Buerger H, Krech R, Boecker W. Tissue microarrays: a new approach for quality control in immunohistochemistry. *J Clin Pathol.* 2002;55:613–615.
- Al-Chalabi A, Miller CC. Neurofilaments and neurological disease. *Bioessays.* 2003;25:346–355.
- Petzold A. Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. *J Neurol Sci.* 2005;233:183–198.
- Ruiz-Ederra J, Garcia M, Hicks D, Vecino E. Comparative study of the three neurofilament subunits within pig and human retinal ganglion cells. *Mol Vis.* 2004;10:83–92.
- Commodaro AG, Bueno V, Belfort R Jr, Rizzo LV. Autoimmune uveitis: the associated proinflammatory molecules and the search for immunoregulation. *Autoimmun Rev.* 2011;10:205–209.
- Caspi RR. Understanding autoimmune uveitis through animal models: The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:1872–1879.
- Snir O, Widhe M, Hermansson M, et al. Antibodies to several citrullinated antigens are enriched in the joints of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* 2010;62:44–52.
- Deeg CA, Altmann F, Hauck SM, et al. Down-regulation of pigment epithelium-derived factor in uveitic lesion associates with focal vascular endothelial growth factor expression and breakdown of the blood-retinal barrier. *Proteomics.* 2007;7:1540–1548.
- Bevan MJ. Understand memory, design better vaccines. *Nat Immunol.* 2011;12:463–465.
- Cooper NR. The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Adv Immunol.* 1985;37:151–216.
- Manickam B, Jha P, Matta B, Liu J, Bora PS, Bora NS. Inhibition of complement alternative pathway suppresses experimental autoimmune anterior uveitis by modulating T cell responses. *J Biol Chem.* 2011;286:8472–8480.
- Jha P, Bora PS, Bora NS. The role of complement system in ocular diseases including uveitis and macular degeneration. *Mol Immunol.* 2007;44:3901–3908.
- Zipplies JK, Kirschfink M, Amann B, Hauck SM, Stangassinger M, Deeg CA. Complement factor B expression profile in a spontaneous uveitis model. *Immunobiology.* 2010;215:949–955.
- Gutierrez C, McNally M, Canto-Soler MV. Cytoskeleton proteins previously considered exclusive to ganglion cells are transiently expressed by all retinal neuronal precursors. *BMC Dev Biol.* 2011;11:46.
- Peichl L, Gonzalez-Soriano J. Unexpected presence of neurofilaments in axon-bearing horizontal cells of the mammalian retina. *J Neurosci.* 1993;13:4091–4100.
- Knabe W, Washausen S, Happel N, Kuhn HJ. Development of starburst cholinergic amacrine cells in the retina of Tupaia belangeri. *J Comp Neurol.* 2007;502:584–597.
- Balaratnasingam C, Morgan WH, Bass L, Kang M, Cringle SJ, Yu DY. Time-dependent effects of focal retinal ischemia on axonal cytoskeleton proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:3019–3028.
- Balaratnasingam C, Morgan WH, Bass L, Matich G, Cringle SJ, Yu DY. Axonal transport and cytoskeletal changes in the laminar regions after elevated intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:3632–3644.
- Balaratnasingam C, Morgan WH, Bass L, Cringle SJ, Yu DY. Time-dependent effects of elevated intraocular pressure on optic nerve head axonal transport and cytoskeleton proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:986–999.
- Huang X, Kong W, Zhou Y, Gregori G. Distortion of axonal cytoskeleton: an early sign of glaucomatous damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:2879–2888.
- Pease ME, McKinnon SJ, Quigley HA, Kerrigan-Baumrind LA, Zack DJ. Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:764–774.
- Petzold A, Junemann A, Rejdak K, et al. A novel biomarker for retinal degeneration: vitreous body neurofilament proteins. *J Neural Transm.* 2009;116:1601–1606.
- Mond JJ, Lees A, Snapper CM. T cell-independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:655–692.
- Vos Q, Lees A, Wu ZQ, Snapper CM, Mond JJ. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunol Rev.* 2000;176:154–170.
- Perrot R, Berges R, Bocquet A, Eyer J. Review of the multiple aspects of neurofilament functions, and their possible contribution to neurodegeneration. *Mol Neurobiol.* 2008;38:27–65.
- Yuan A, Rao MV, Sasaki T, et al. Alpha-internexin is structurally and functionally associated with the neurofilament triplet proteins in the mature CNS. *J Neurosci.* 2006;26:10006–10019.
- Deng Y, Li B, Liu F, et al. Regulation between O-GlcNAcylation and phosphorylation of neurofilament-M and their dysregulation in Alzheimer disease. *FASEB J.* 2008;22:138–145.
- Barry DM, Carpenter C, Yager C, et al. Variation of the neurofilament medium KSP repeat sub-domain across mammalian species: implications for altering axonal structure. *J Exp Biol.* 2010;213:128–136.
- Yano T, Yamada K, Kimura A, et al. Autoimmunity against neurofilament protein and its possible association with HLA-DRB1*1502 allele in glaucoma. *Immunol Lett.* 2005;100:164–169.

46. Zhang Y, Li X, Qiao J. Neurofilament protein light in multiple sclerosis (in Chinese). *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2007;87:2745-2749.
47. Bartos A, Fialova L, Soukupova J, Kukal J, Malbohan I, Pitha J. Antibodies against light neurofilaments in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand*. 2007;116:100-107.
48. Salih AM, Nixon NB, Dawes PT, Matthey DL. Prevalence of antibodies to neurofilament polypeptides in patients with rheumatoid arthritis complicated by peripheral neuropathy. *Clin Exp Rheumatol*. 1998;16:689-694.
49. Karlsson JE, Rosengren LE, Haglid KG. Polyclonal antisera to the individual neurofilament triplet proteins: a characterization using ELISA and immunoblotting. *J Neurochem*. 1989;53:759-765.
50. Taylor AW, Kaplan HJ. Ocular immune privilege in the year 2010: ocular immune privilege and uveitis. *Ocul Immunol Inflamm*. 2010;18:488-492.
51. Nuti F, Peroni E, Real-Fernandez F, et al. Posttranslationally modified peptides efficiently mimicking neoantigens: a challenge for theragnostics of autoimmune diseases. *Biopolymers*. 2010;94:791-799.

4 DISKUSSION

Die ERU gehört zu den häufigsten Gründen für eine Erblindung bei Pferden und hat weltweit eine sehr hohe Prävalenz (Gilger et al. 2010). Aufgrund der Schmerzhaftigkeit akuter Entzündungsschübe und der zunehmenden Einschränkung des visuellen Wahrnehmungsvermögens, die erheblichen Stress für das Fluchttier Pferd darstellt, ist der Leidensdruck erkrankter Pferde hoch. Auch macht eine Erblindung häufig die Euthanasie des betroffenen Pferdes nötig, da es für sich selbst und für seine Umwelt eine Gefahr darstellen kann (Eberhardt 2011). Die rezidivierende Uveitis des Pferdes ist außerdem ein wertvolles Modell für die autoimmune Uveitis des Menschen, da sie auf einmalige Weise das Vorhandensein von spontaner und induzierbarer Krankheit in einer Spezies vereint (Deeg et al. 2006b).

Zwar gibt es momentan keine kausale Therapie für die ERU, doch wird seit einigen Jahren an der Pferdeklinik der LMU München routinemäßig eine Pars plana Vitrektomie an ERU-Patienten durchgeführt (Werry and Gerhards 1992). Inzwischen stellt die Pferdeklinik der LMU München ein europäisches Zentrum für diesen Eingriff dar, so dass frisches vitreales Probenmaterial von ERU-Patienten in großer Anzahl zur Verfügung steht. Dies schafft eine hervorragende Ausgangslage, um die autoaggressiven Reaktionen zu untersuchen, die sich im intraokulären Bereich abspielen. So konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass bei 72% der untersuchten ERU-Patienten intraokuläre IgG-Antikörper gegen die retinalen Proteine IRBP und S-Antigen vorlagen (Deeg et al. 2001). Um aber die Frage, ob das intraokuläre Antikörperrepertoire für bislang nicht identifizierte retinale Antigene spezifisch ist, zu beantworten, befasste sich die im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführte Studie mit der Identifikation von Zielstrukturen, die von intraokulären Autoantikörpern gebunden werden. Auch wenn in der Vergangenheit schon verschiedene Autoantigene bei der ERU identifiziert wurden (Deeg et al. 2001; Deeg et al. 2006b), so ist die Suche nach Autoantigenen keinesfalls als beendet zu betrachten und immer noch notwendig, um die Pathogenesemechanismen in ihrer ganzen Komplexität verstehen zu können. Im Idealfall sollte das gesamte Spektrum beteiligter immunkompetenter Zellen und Moleküle sowie deren Zielstrukturen vollständig bekannt sein, und ist nicht als „Briefmarkensammlung“ anzusehen, da die

Identifikation neuer Autoantigene unmittelbare, greifbare Folgen für Patienten mit Autoimmunkrankheiten haben kann, wie an einem aktuellen humanmedizinischen Beispiel, der Entdeckung von AQP4 als Autoantigen bei Neuromyelitis optica (Papadopoulos and Verkman 2012), besonders deutlich wird. Die Identifikation von AQP4 als Autoantigen ermöglichte zum einen, dass die Neuromyelitis optica als eigenständige Krankheit erkannt wurde, nachdem sie jahrzehntelang für eine Variante von Multipler Sklerose gehalten worden war (Roemer et al. 2007). Zum anderen wurden viele Patienten mit Neuromyelitis optica durch diese Unterscheidungsmöglichkeit vor einer Fehltherapie bewahrt, da zum Beispiel die Gabe von Interferon beta, die bei der Multiplen Sklerose angewendet wird, im Gegensatz dazu bei Neuromyelitis optica ineffektiv ist (Uzawa et al. 2010) oder sogar den Verlauf verschlimmert (Lennon et al. 2004; Palace et al. 2010). Interessanterweise gibt es bei der Multiplen Sklerose Patienten, die sehr gut auf die Therapie mit Interferon beta ansprechen und andererseits sogenannte Non-Responder (Rudick et al. 2004; Rio et al. 2006). Unter anderem wird ein Unterschied im Genotyp des Interferon Regulatory Factor 5 von Non-Respondern als Grund hierfür diskutiert (Vosslamber et al. 2011). Neben einer genetischen Varianz bei Interferon Regulatory Factor 5 könnten aber auch noch weitere Faktoren wie Krankheitsverläufe oder bisher unentdeckte Untergruppen analog zu Neuromyelitis optica beteiligt sein, daher wird in diesem Bereich immer noch geforscht.

Eine auf dem Autoantigenspektrum basierende Abgrenzung von Varianten oder Entitäten untereinander könnte in Zukunft auch für die ERU relevant sein. Bei der ERU ist es derzeit so, dass Patienten ganz unterschiedliche klinische Ausprägungen haben können oder, umgekehrt betrachtet, dass sehr viele unterschiedliche klinische Ausprägungen als ERU klassifiziert werden (Spiess 2010). Bedenkt man zudem die hohe Prävalenz der ERU, die bei etwa 10% liegt (Spiess 2010), so ist es möglich, dass die momentane Bezeichnung ERU nur ein Sammelbegriff ist, unter dem sich ganz unterschiedliche Ausprägungen oder sogar Entitäten verbergen, die noch näher charakterisiert werden müssen, um sie voneinander abgrenzen zu können. Eine Abgrenzung unterschiedlicher Varianten der ERU könnte irgendwann dazu führen, dass für diese Varianten eine kausale Therapie gefunden werden kann. Dabei stellt sich für NF-M, das im Rahmen dieser Dissertation als neues Autoantigen identifiziert wurde (Publikation, Abbildung 1), nun die Frage: inwiefern ist es relevant für die Pathogenese der ERU und inwiefern könnte es bei dem Teil der ERU-Patienten, die

eine Autoreaktivität darauf zeigen (Publikation, Abbildung 2), für einen Unterschied in Krankheitsverlauf oder Symptomatik sorgen? Der Beitrag einer Autoreaktivität zur Pathogenese einer Erkrankung kann in direktem Zusammenhang mit den physiologischen Funktionen des targetierten Autoantigens stehen. Wie die immunhistochemische Analyse zeigte, handelt es sich bei NF-M um ein Protein, das in der gesunden Pferde retina vor allem in retinalen Ganglienzellen und in Horizontalzellen exprimiert wird (Publikation, Abbildung 3A). Neurofilamente gehören zu den Intermediärfilamenten, diese sind wiederum Bestandteil des neuronalen Zytoskeletts (Ishikawa et al. 1968). Bei Säugetieren besteht das sogenannte Neurofilament-Triplett aus drei verschiedenen Einheiten, deren Namen sich von ihren unterschiedlichen Molekulargewichten ableiten: die leichte Untereinheit Neurofilament-L (NF-L); die mittlere Untereinheit Neurofilament-M (syn. Neurofilament medium; NF-M); und die schwere (engl. heavy) Untereinheit Neurofilament-H (NF-H) (Perrot et al. 2008). Alpha-Internexin wird in jüngerer Zeit als putative vierte Untereinheit angesehen (Yuan et al. 2006). Die Untereinheiten bilden ein heteropolymeres Netzwerk innerhalb der neuronalen Zelle, das in Axonen besonders ausgeprägt ist (Perrot et al. 2008), was das besonders intensive NF-M-Signal in der Nervenfaserschicht gesunder Retinae erklärt (Publikation, Abbildung 3A). Offenbar exprimieren aber nicht alle retinalen Ganglienzellen des Pferdes NF-M, da wir einige Ganglienzellen ohne NF-M-Signal in Retinapräparaten gesunder Pferde beobachten konnten (Publikation, Abbildung 3A). Zumeist handelte es sich dabei um kleine Ganglienzellen. Dieser Befund könnte darauf hinweisen, dass es bei den zwei Arten retinaler Ganglienzellen, die beim Pferd beschrieben sind, nämlich große und kleine Ganglienzellen (Ehrenhofer et al. 2002), wahrscheinlich Untergruppen gibt, die sich in ihrer Neurofilament-Komposition unterscheiden und in zukünftigen Studien näher charakterisiert werden sollten. Zusätzlich zu den retinalen Ganglienzellen färbte sich eine Zellpopulation in der äußeren plexiformen Schicht an, die nach Lokalisation und Morphologie sehr wahrscheinlich aus Horizontalzellen besteht (Publikation, Abbildung 3A). Die Expression von NF-M in Horizontalzellen, zusammen mit den anderen Untereinheiten, ist bei einer ganzen Reihe verschiedener Säugetiere beschrieben worden (Shaw and Weber 1984; Peichl and Gonzalez-Soriano 1993). Das Expressionsmuster von NF-M in der Retina des Pferdes ähnelt interessanterweise besonders der Retina des Schweines, welches als Modellorganismus für die Glaukomforschung dient (Ruiz-Ederra et al. 2004;

Balaratnasingam et al. 2007; Balaratnasingam et al. 2008; Balaratnasingam et al. 2010). NF-M wird in der Schweineretina ebenfalls in retinalen Ganglienzellen und ihren Fortsätzen exprimiert, wobei sich auch hier kleine Ganglienzellen weniger häufig anfärben und die NF-M-Expression in der äußeren plexiformen Schicht Horizontalzellen zugeordnet wird (Ruiz-Ederra et al. 2004). Horizontalzellen sind retinale Interneurone, die bei den meisten Säugern in zwei morphologischen Varianten, Typ A und Typ B, vorkommen (Masland 2001). Es gibt aber Ausnahmen wie zum Beispiel Maus und Ratte, die nur Horizontalzellen Typ B haben (Masland 2001). Eine Horizontalzelle ist querverschaltet mit mehreren Photorezeptorzellen und Bipolarzellen (Fahrenfort et al. 2005). Wie die meisten anderen Säugetiere besitzen Pferde Horizontalzellen des Typs B, deren einzelnes Axon mit Stäbchen verbunden ist, während ihre Dendriten mit Zapfen Synapsen eingehen (Sandmann et al. 1996). Beim Pferd haben Horizontalzellen des Typs A kein Axon, sondern ein weitverzweigtes Feld von Dendriten (Sandmann et al. 1996). Diese Dendriten gehen als Besonderheit beim Pferd selektiv mit S-Zapfen Synapsen ein, welche für das Blausehen zuständig sind (Sandmann et al. 1996). Die Physiologie der Horizontalzellen ist generell noch wenig erforscht, allerdings weiß man, dass sie benötigt werden, um die Empfindlichkeit des visuellen Systems auf unterschiedliche Lichtintensitäten des Hintergrunds anzupassen und so starke Kontraste in der Lichtintensität auszugleichen (Trumpler et al. 2008). Bei einem Ausfall von Horizontalzellen wäre zu erwarten, dass dieser Kontrastausgleich nicht mehr stattfindet, was bei der ERU zu einer Photophobie beitragen könnte.

Neurofilamente haben in den Zellen, in denen sie exprimiert werden, unterschiedliche Funktionen. Sie sind zum einen wichtige Regulatoren des axonalen Kalibers (Friede and Samorajski 1970; Hoffman et al. 1984; Xu et al. 1996). So wiesen bei NF-M Knockout-Mäusen vor allem große myelinisierte Axone deutlich reduzierte Durchmesser auf, was bei NF-H-Knockout-Mäusen aus der gleichen Studie weit weniger ausgeprägt war (Jacomy et al. 1999). Überraschenderweise wurden offensichtliche Verhaltensauffälligkeiten weder bei NF-M-Knockout-Mäusen (Elder et al. 1998; Jacomy et al. 1999) noch bei NF-M / NF-H-Knockout-Mäusen (Jacomy et al. 1999) beobachtet. Beim Menschen dagegen stehen Abnormalitäten bei Metabolismus, Transport oder Expression von Neurofilamenten im Zusammenhang mit schwerwiegenden neurologischen Störungen (Perrot et al. 2008). So können verschiedene genetische Mutationen bei Neurofilament-L bei Patienten mit

verschiedenen Varianten von Morbus Charcot-Marie-Tooth assoziiert werden (Perrot et al. 2008; Abe et al. 2009; Yum et al. 2009). Morbus Charcot-Marie-Tooth ist auch unter dem Namen hereditäre motorisch-sensible Neuropathie bekannt (Reilly et al. 2011). Dieser Begriff umfasst eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe von Erkrankungen, die von Muskelschwund, Muskelschwäche und einem Verlust sensorischer Funktionen vor allem im distalen Bereich der Gliedmaßen gekennzeichnet werden (Reilly et al. 2011). Unterschiedliche Mutationen am NF-M-Gen wurden bei einigen Patienten mit der Parkinson'schen Erkrankung gefunden, allerdings ist noch unklar, in welcher Weise diese an der Krankheit beteiligt sind (Lavedan et al. 2002; Kruger et al. 2003). Nachdem die Gly336Ser Mutation am NF-M-Gen zuvor bei einem Patienten mit besonders akutem Verlauf beschrieben worden war (Lavedan et al. 2002), wurde eine Studie durchgeführt, in der eine Gruppe von 102 Parkinson-Patienten mit ähnlichem ethnischen Hintergrund auf diese Mutation getestet wurden (Han et al. 2005). Die Gly336Ser-Mutation konnte hier zwar nicht wieder gefunden werden, allerdings verwiesen die Autoren auf die Möglichkeit, dass bei dieser Patientengruppe auch Mutationen an anderen Orten des NF-M-Gens vorliegen könnten (Han et al. 2005). NF-M ist bei der Parkinson'schen Erkrankung auch noch in einem anderen Zusammenhang beschrieben worden, und zwar als Bestandteil der Lewy-Bodies (Hill et al. 1991; Pollanen et al. 1993). Lewy-Bodies sind eosinophile neuronale Einschlüsse, die aus einem Aggregat von Fibrillen von etwa 8-10 nm Länge bestehen (Pollanen et al. 1993). Sie sind ein charakteristisches histologisches Kennzeichen bei Parkinson-Patienten (Goldman et al. 1983). Interessanterweise ist bei der Parkinson'schen Erkrankung, die eine der häufigsten neurodegenerativen Krankheiten ist, wohl auch eine autoimmune Komponente beteiligt (Mosley et al. 2012). Retinale Ganglienzellen und Horizontalzellen, die in der Retina des Pferdes im physiologischen Zustand NF-M exprimieren (Publikation, Abbildung 3A), könnten in Folge eines autoimmunen Angriffs auf dieses Protein also ein vermindertes axonales Volumen und eine reduzierte Leitungsfähigkeit haben, da das Volumen einen großen Einfluss auf die Leitungsgeschwindigkeit in Axonen hat (Sakaguchi et al. 1993). Die wichtige Rolle, die für die Mutation eines anderen Neurofilaments, NF-L, bei Morbus Charcot-Marie-Tooth nachgewiesen wurde, deutet darauf hin, dass Defekte bei Neurofilamenten durchaus zu neurologischen Störungen führen können. Problematisch an der Übertragung der eben genannten Daten, insbesondere aus NF-M-Knockout-Modellen (Elder et al. 1998; Jacomy et al. 1999)

ist aber, dass der Mangel von Anfang an vorliegt, bei der ERU allerdings dieser Mangel (Publikation, 3B) erst sekundär eintritt. Wahrscheinlich ist auch, dass dieser Mangel bestehen bleibt und progressiv fortschreitet, sobald er einmal eingetreten ist. Neuronale Zellen haben im Allgemeinen ein eher geringes Regenerationspotenzial (Mikucki and Oblinger 1991). Zusätzlich stehen Neurofilamente in direktem Zusammenhang mit axonaler Regeneration, bei der sie in verletzten Axonen des peripheren Nervensystems für die Dauer des Heilungsprozesses vermehrt exprimiert werden (Hoffman and Cleveland 1988; Muma et al. 1990). Am Nervus opticus des Krallenfrosches, *Xenopus laevis*, konnte gezeigt werden, dass nach experimentellem Stoßtrauma, nur die Axone, die erfolgreich regenerieren, vermehrt NF-M exprimieren, wohingegen bei Axonen, die das nicht schafften, der Expressionsanstieg ausblieb (Gervasi et al. 2003). Es ist somit zu erwarten, dass nach einer erfolgten Schädigung dieser Strukturen bei an ERU erkrankten Retinae die Expression von NF-M nie mehr zu einem physiologischen Zustand zurückgeführt werden kann. Die Verminderung des NF-M-Gehalts könnte auch direkt auf Axone hinweisen, die so stark beschädigt sind, dass sie nicht mehr regenerieren können. Die Reduktion von NF-M, die bei einem Großteil (89%) der ERU-Retinae nachgewiesen wurde (Publikation, Abbildung 3B), könnte vielleicht auch einen Einfluss auf die Expression der anderen Untereinheiten haben. Bei NF-M-Knockout-Mäusen wurde beispielsweise neben insgesamt verringerten axonalen Durchmessern im gesamten Organismus eine erhöhte Expression von NF-H, aber eine drastisch verringerte Expression von NF-L beobachtet, was darauf hindeutet, dass es einen regulatorischen Zusammenhang bei der Expression der einzelnen Untereinheiten gibt (Elder et al. 1998). Besonders ausgeprägt scheint die Koregulation bei NF-L und NF-M zu sein (Zhu et al. 1997). Im Falle einer aktiven Herunterregulierung von NF-M wäre es möglich, dass über einen übergeordneten Regulationsmechanismus, der auf zellulären Stress reagiert, auch die Regulation der anderen Untereinheiten verändert wird. Allerdings gilt auch hier zu bedenken, dass die Situation im Knockoutmodell sich durch den primären Defekt von der Situation bei der ERU-Erkrankung mit ihrem sekundären Mangel unterscheidet. Momentan (Pub Med Recherche, Stand: 10. September 2012) gibt es zwar keine Informationen über die Rolle von Neurofilamenten oder retinalen Ganglienzellen bei der autoimmunen Uveitis des Menschen, allerdings gibt es Untersuchungen zur Rolle beider Strukturen im Rahmen der Glaukomforschung im Schweinemodell (Balaratnasingam et al. 2007; Balaratnasingam et al. 2010). Hier konnte mittels

Immunhistochemie gezeigt werden, dass nach experimenteller Erhöhung des Augeninnendrucks der NF-M-Gehalt des Sehnervenkopfes deutlich reduziert ist (Balaratnasingam et al. 2007) und auch die experimentelle Induktion fokaler retinaler Ischämie hatte ein reduziertes retinales NF-M Signal zur Folge (Balaratnasingam et al. 2010). Interessanterweise wurde hierbei außerdem beobachtet, dass sich die Expression der Neurofilamente in retinalen Ganglienzellen bereits verändert, bevor es zu einer Dysregulation des axonalen Transports kommt (Balaratnasingam et al. 2007; Balaratnasingam et al. 2010), was wiederum zu apoptotischem Zelltod führen kann (Pease et al. 2000). Aufgrund dieser Ergebnisse stellten die Autoren dieser Studien die These auf, dass ein verringerter Gehalt an Neurofilamenten in retinalen Ganglienzellen ein frühes Warnzeichen für eine Beschädigung dieser Zellen sein könnte (Balaratnasingam et al. 2007; Balaratnasingam et al. 2010). Als initiierender Faktor für die Reduktion axonalen Neurofilament-Gehalts bei erhöhtem intraokulärem Druck wurde eine verminderte Phosphorylierung der C-terminalen-Region von NF-M und NF-H vorgeschlagen, die diese Untereinheiten anfälliger für Proteolyse machen könnte (Balaratnasingam et al. 2007). Interessanterweise ergaben sich in den letzten Jahren Hinweise darauf, dass nicht nur ein erhöhter Augeninnendruck einen Risikofaktor für ein Glaukom darstellt, sondern dass wahrscheinlich auch autoimmune Vorgänge eine Rolle spielen (Tezel et al. 1998; Maruyama et al. 2000; Joachim et al. 2005; Boehm et al. 2012). Unter anderem wurden dabei vermehrt IgG-Autoantikörper gegen NF-L im Serum von Glaukompatienten nachgewiesen (Yano et al. 2005). Da häufig Autoreaktivitäten bei Patienten nachgewiesen wurden, die bei normalem Augeninnendruck ein Glaukom entwickelten, wird inzwischen diskutiert, ob bei diesen Patienten das Glaukom autoimmun bedingt sein könnte (Joachim et al. 2005; Wax 2011). Ein autoimmun bedingtes Glaukom stellt zur Zeit allerdings nur eine Ausschlussdiagnose dar, weil belastbare Parameter zur Diagnose im Moment noch fehlen (Wax 2011).

Auch ist noch unbekannt, ob Autoantikörper gegen Neurofilamente direkt zytotoxisch auf retinale Zellen wirken oder ob sie eine Veränderung in der Neurofilament-Zusammensetzung verursachen können (Pub Med Recherche, Stand 11. September 2012). Für die Verringerung des NF-M-Signals bei von ERU betroffenen Retinae, die in dieser Studie festgestellt wurde, gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten, die sich gegenseitig nicht ausschließen und möglicherweise auch gemeinsam auftreten können. Eine Möglichkeit ist, dass bei der ERU retinale Ganglienzellen als Reaktion

auf die Entzündungsreaktion NF-M aktiv herunterregulieren, ähnlich wie es im porzinen Glaukommodell gezeigt wurde (Balaratnasingam et al. 2007; Balaratnasingam et al. 2010).

Die Tatsache, dass speziell IgM Antikörper an der Reaktion gegen NF-M beteiligt sind, könnte hier eine besondere Rolle spielen. Möglicherweise potenziert die IgM-Reaktion, die sich gegen NF-M richtet, die Entzündung durch eine Aktivierung des Komplementsystems, da IgM ein hoch potenter Aktivator des Komplementsystems ist (Cooper 1985; Schroeder and Cavacini 2010). Die Komplementkaskade verstärkt intraokuläre inflammatorische Prozesse und die Zerstörung von Geweben bei der experimentellen autoimmunen anterioren Uveitis der Ratte (Jha et al. 2006; Manickam et al. 2011). Auch bei der ERU wurde die Beteiligung des Komplementsystems nachgewiesen (Zipplies et al. 2010a; Zipplies et al. 2010b). Spaltprodukte der Komplementkaskade, nämlich B/Ba, B/Bb, Bb neoantigen, iC3b und C3d lagen in Seren von ERU-Patienten in signifikant höheren Konzentrationen vor als bei gesunden Kontrollen (Zipplies et al. 2010b). Auch lokal, auf eingewanderten Leukozyten in der Retina fand bei der ERU eine Aktivierung der Komplementkaskade statt, hier konnte C3d zusammen mit Bb neoantigen auf CD68-positiven Zellen (Makrophagen) und auf Lymphozyten nachgewiesen werden (Zipplies et al. 2010b). Im Allgemeinen war das Komplementsystem bis dahin in der Uveitisforschung eher wenig beachtet worden (Bora et al. 2008). Auch ging man zu dem Zeitpunkt davon aus, dass intraokuläre Komplementaktivierung hauptsächlich durch eine Dysregulation der Expression von Komplement-regulierenden Proteinen durch retinale Zellen vermittelt war (Bora et al. 2008). Dass sich bei der ERU herausstellte, dass aktivierte Moleküle des Komplementsystems sich vor allem auf eingewanderten Makrophagen befanden, stellte daher ein Novum dar (Zipplies et al. 2010b).

Neben der Rolle des Komplementsystems und seiner Aktivierung durch IgM gibt es weitere Ergebnisse, die auf eine Zerstörung der exprimierenden Strukturen hinweisen. Daten aus differenzialproteomischen Experimenten zeigten, dass in der Retina von ERU-Patienten alle Neurofilament-Untereinheiten um etwa denselben Faktor vermindert exprimiert wurden (Hauck et al. 2010). Dies deutet auch eher auf einen destruktiven Prozess als auf eine differenzierte Herunterregulation der Neurofilamentexpression hin. Interessanterweise wurde bei Menschen mit verschiedenen Ausprägungen retinaler Degeneration nachgewiesen, dass die

Beschädigung retinaler Ganglienzellen zu einer vermehrten Freisetzung von NF-H in den Glaskörper führen kann (Petzold et al. 2009). Auch bei Multipler Sklerose wird eine erhöhte Konzentration von Neurofilament-Proteinen im Liquor von Patienten als Marker für eine vorliegende Beschädigung von Axonen gewertet ((Malmestrom et al. 2003; Haghighi et al. 2004; Kuhle et al. 2011). Wäre es auch bei der ERU der Fall, dass vermehrt NF-M frei im Glaskörper vorliegt anstatt wie physiologischerweise im Retinagewebe, zum Beispiel in Form von Bruchstücken beschädigter oder toter Zellen, könnte dies als antigener Stimulus für infiltrierende Zellen wirken und so die Reaktion gegen NF-M in Gang halten oder überhaupt verursachen. Da allerdings bei vergleichenden proteomischen Analysen von Glaskörperproben gesunder Tiere und von an ERU erkrankten Pferden Neurofilamente nie als differenziell reguliert in Erscheinung getreten sind (Deeg et al. 2007a; Hauck et al. 2012), ist es sehr unwahrscheinlich, dass Neurofilamente in wesentlichen Mengen in den Glaskörper freigesetzt werden. Doch um als antigener Stimulus zu wirken, müsste NF-M nicht zwingend freigesetzt werden. Auch auf Trümmern beschädigter Zellen, die sich noch im Gewebeverband befinden, wäre NF-M für einwandernde Leukozyten besser zugänglich als innerhalb intakter Zellen. Auf diese Weise könnte es zum Epitop-Spreading beitragen. Epitop-Spreading ist ein Mechanismus, der sowohl für die spontane Erkrankung (Deeg et al. 2006a; Deeg et al. 2006b) als auch die mit IRBP induzierte (Deeg et al. 2002b) experimentelle Uveitis des Pferdes nachgewiesen werden konnte. Epitop-Spreading ist bei autoimmunen Krankheiten (Vanderlugt and Miller 2002), und bei Virusinfektionen (Miller et al. 1997) bekannt. Bei Autoimmunkrankheiten handelt es sich dabei um einen Prozess, bei dem sich das ursprüngliche autoreaktive Repertoire um neue Antigen-Determinanten erweitert, welche beim intramolekularen Spreading neue Epitope auf dem selben Molekül sein können oder aber beim intermolekularen Spreading ganz neue Moleküle (Vanderlugt and Miller 2002). Bei Virusinfektionen wie der murinen Theiler'schen Enzephalomyelitis richtet sich die Immunantwort, die anfangs gegen das im zentralen Nervensystem persistierende Virus gerichtet ist, im Verlauf der Krankheit auf körpereigene Myelin-Epitope (Miller et al. 1997). Erstmals entdeckt wurde das Epitop-Spreading am Anfang der 1990er Jahre bei einer rezidivierenden Variante von experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis, einem Mausmodell für die Multiple Sklerose (Lehmann et al. 1992). Auch erbrachte eine weiterführende Studie im selben Mausmodell erstmals Hinweise darauf, dass intra- und intermolekulares

Epitop-Spreading pathogenetisch relevant für die rezidivierende Autoimmunität ist (McRae et al. 1995). Ein zentraler Aspekt hierbei ist, dass es durch eine Beschädigung von Zellen zu einer Freilegung vorher nicht zugänglicher, sogenannter kryptischer Epitope kommen kann, gegen die dann eine Autoimmunantwort neu induziert wird (Vanderlugt and Miller 2002). Im Rahmen der autoimmunen Uveitis des Menschen wurde für S-Antigen intramolekulares Epitop-Spreading beschrieben (de Smet et al. 2001). Hier zeigte sich, dass sich das Spreading in frühen Stadien der Erkrankung bevorzugt auf einige wenige Determinanten richtet, in einem chronischen Stadium aber eine große Breite von S-Antigen Determinanten erkannt wird (de Smet et al. 2001). Auch bei der ERU, mit ihrem charakteristischen rezidivierenden Verlauf trägt das Epitop-Spreading wahrscheinlich zur Entstehung neuer Entzündungsschübe bei, wie eine Studie aus dem Jahr 2006 beweisen konnte (Deeg et al. 2006a). Hier zeigte sich bei allen acht untersuchten an ERU erkrankten Pferden ein intermolekulares Epitop-Spreading zwischen IRBP und S-Antigen, wobei bei fünf Tieren S-Antigen zu einem früheren Zeitpunkt als IRBP erkannt wurde (Deeg et al. 2006a). Bei dem Großteil der ERU-Patienten konnte auch ein intramolekulares Spreading innerhalb des S-Antigen und des IRBP-Moleküls nachgewiesen werden (Deeg et al. 2006a). Zwar wurde hier kein hierarchisches, vorhersagbares Muster des Spreadings, wie bei der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (Yu et al. 1996; Tuohy et al. 1998) entdeckt, allerdings war eine Verschiebung des Autoantigenspektrums meist mit dem Auftreten neuer uveitischer Schübe korreliert (Deeg et al. 2006a).

Bei einer Beschädigung NF-M-exprimierender Zellen könnten einerseits Neurofilamente freigelegt werden und so als Neoepitop eine Autoimmunantwort gegen NF-M induzieren. Hierbei muss der initiale Stressor, der zur Beschädigung NF-M positiver Zellen führt, nicht zwingend die Autoimmunantwort gegen NF-M selbst sein. Diese dann neu induzierte Immunantwort gegen NF-M könnte zur Entstehung eines neuen Entzündungsschubs beitragen. Ob ein intramolekulares Spreading bei NF-M eine Rolle spielt, könnte durch eine Untersuchung der Reaktion auf unterschiedliche Epitope innerhalb von NF-M näher beleuchtet werden, ähnlich wie es bei den ERU-Autoantigenen IRBP und S-Antigen bereits durchgeführt wurde (Deeg et al. 2006a). Ein besonders interessanter Aspekt bei einer Untersuchung der möglichen Rolle von NF-M im Epitop-Spreading der ERU wäre der Zeitpunkt des Entstehens der Antwort auf NF-M im Vergleich zu der Antwort auf andere

Autoantigene, da NF-M auch ein Ankerpunkt sein könnte, von dem ausgehend ein weiteres intermolekulares Spreading auf andere Epitope stattfindet.

Vom Epitop-Spreading bei experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis ist beispielsweise bekannt, dass sich das Autoantigenspektrum mit dem Fortschreiten der Erkrankung sogar in einer vorhersagbaren Reihenfolge erweitert und die neu entstehende Reaktivität gegen spezielle Autoantigene jeweils Stadien der Erkrankung definiert (Yu et al. 1996; Tuohy et al. 1998). Ein Versuch, der derart exakt eine Reaktionskinetik verfolgen soll, könnte zum einen bei Pferden mit induzierter Uveitis, der Horse Experimental Uveitis, (Deeg et al. 2002b) durchgeführt werden, da man hier durch den Beginn der Immunisierung einen Anfangspunkt der Erkrankung definieren kann. Bei der spontanen Erkrankung ERU ist das Erkennen von Krankheitssymptomen im frühesten Stadium sehr schwierig, daher ist so ein Versuchsaufbau nicht durchführbar. Hier wäre eine retrograde Herangehensweise notwendig. Von einer großen Population könnte regelmäßig Blut gewonnen und die Immunantwort der Tiere, die ERU entwickelt haben, rückblickend analysiert werden.

Leider konnte eine vorhersagbare Hierarchie des Spreadings bislang nur in dem artifiziellen Mausmodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (Yu et al. 1996; Tuohy et al. 1998), aber bei keiner spontanen Erkrankung nachgewiesen werden. Anders als bei Versuchen an Mausstämmen mit identischem genetischen Hintergrund und einer standardisiert induzierten Erkrankung, liegen bei ERU eine genetisch heterogene Population und unterschiedliche Krankheitsverläufe vor. Eine vorhersagbar hierarchische Abfolge des Epitop-Spreadings ist daher eher nicht zu erwarten. Relevant wäre im Fall von NF-M zudem auch nur, ob es ganz zu Beginn der Erkrankung targetiert wird, um möglicherweise eines Tages einen Punkt zu haben, an dem man früh eingreifen kann. Insgesamt wäre aber der Aufwand einer wie zuvor beschrieben großen, retrograd angelegten Studie allein zum Zweck der Verfolgung der Reaktionskinetik im Verhältnis zum Erkenntnisgewinn einer solchen Studie sehr groß. Viel interessanter als die exakte Kinetik ist hier das beteiligte Spektrum der Autoreaktionen. Die Tatsache, dass auch für CRALBP, ein damals neu identifiziertes Autoantigen bei der ERU, eine Teilnahme am intermolekularen Spreading gezeigt werden konnte (Deeg et al. 2006b), weist aber deutlich darauf hin, dass das Spektrum der Autoantigene, die Teil des Epitop-Spreadings sind, offensichtlich nicht auf S-Antigen und IRBP begrenzt ist und es deshalb nötig ist, auch weiterhin nach Autoantigenen zu suchen. In der vorliegenden Dissertation hat

sich gezeigt, dass durch Anpassung des Versuchsaufbaus, die hier in der Betrachtung des Bindungsverhaltens intraokulärer IgM bestand, immer noch neue Autoantigene identifiziert werden können. Durch die Einführung proteomischer Methoden (Deeg et al. 2006b) und die Untersuchung sowohl von intraokulärem Material (Zipplies et al. 2012) als auch Serum (Deeg et al. 2006b) auf Retina-spezifische Autoantikörper ist inzwischen ein sehr breites Spektrum an Herangehensweisen abgedeckt worden. Es gibt aber zwei Arten potenzieller Autoantigene, die als Sonderfälle sozusagen durch das Raster des Versuchsaufbaus gerutscht sein könnten. Es sind zum einen solche, gegen die bei gesunden Tieren als auch bei ERU-Patienten IgG unterschiedliche Isotypen gebildet werden, wo aber kein numerischer Unterschied in der Prävalenz der Gesamt-IgG Reaktion sichtbar ist. Der zweite Sonderfall sind Oberflächenproteine, die aufgrund ihrer Lage in der Zellmembran große hydrophobe Anteile haben und daher nur schlecht löslich sind (Grant and Wu 2007). Zur Aufbereitung und optimalen Analyse solcher Proteine sind spezialisierte Protokolle nötig (Hauck et al. 2010).

Zukünftige Studien werden notwendig sein, die den Grund für die beobachtete Verminderung der NF-M-Expression in an ERU erkrankten Retinae (Publikation, Abbildung 3B) näher beleuchten. Dies wäre beispielsweise durch die Untersuchung der Reaktion retinaler Ganglienzellen oder Horizontalzellen auf anti-NF-M-Antikörper in Zellkultur möglich. Die Verwendung von retinalen Zelllinien könnte hierbei auch eine erste Untersuchung der Kinetik der Neurofilament-Expression ermöglichen, indem zum Beispiel die Zellen *in vitro* mit Glaskörperproben von ERU-Patienten inkubiert werden, deren Neurofilament-Expression dann zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Versuchs untersucht werden könnte. Ein weiterer sehr wichtiger Punkt, der über den Rahmen dieser Studie hinausging, der aber in Zukunft untersucht werden sollte, ist ein Zusammenhang zwischen dem anti-NF-M-Antikörperstatus eines ERU-Patienten und der NF-M-Expression in seiner Retina, da dies weitere Informationen über einen möglichen kausalen Zusammenhang dieser beiden Faktoren bringen würde. Eine Schwierigkeit bei dieser Herangehensweise wird aber sein, dass man auf diese Weise mehr Informationen über die Situation in späten Stadien der ERU gewinnt als über frühe Stadien und vor allem, dass die wiederholte Gewinnung von intraokulärem Probenmaterial bei ERU-Patienten nicht möglich ist.

Um eine pathogenetische Relevanz und ein uveitogenes Potenzial von NF-M als Autoantigen bei der ERU endgültig zu klären, wäre außerdem ein Versuch notwendig, bei dem gesunde Pferde mit NF-M immunisiert werden. Würden NF-M immunisierte Pferde Uveitis-Symptome entwickeln, wäre das die Bestätigung, dass eine Reaktion gegen NF-M eine Uveitis induzieren kann. Auch wäre es möglich, zu untersuchen, an welchen Läsionen im Retinagewebe oder an welcher Symptomatik die Autoimmunreaktion direkten Anteil hat. Für den Fall, dass NF-M keine Uveitis induzieren kann, so hätte man einen Hinweis darauf, dass es sich bei der Autoimmunreaktion nicht um einen initiierenden Faktor, sondern um ein Epiphänomen handelt. Als Epiphänomen könnte die Reaktion in einem solchen Fall deshalb eingestuft werden, weil man davon ausgehen könnte, dass die Uveitis-Pathologie bei der Spontanerkrankung im wesentlichen von anderen Reaktionen als der gegen NF-M initiiert wird und dass sich die Reaktion gegen NF-M möglicherweise erst sekundär durch progressive Gewebszerstörung im Krankheitsverlauf entwickelt, wie im Zusammenhang mit Epitop-Spreading zuvor beschrieben (Vanderlugt and Miller 2002).

Eine Autoreaktivität gegen NF-M ist bei autoimmuner Uveitis bisher nicht beschrieben worden, allerdings spielt NF-M eine Rolle bei Multipler Sklerose (Krishnamoorthy et al. 2009). Bei Knockout-Mäusen, die Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG; ein Autoantigen bei Multipler Sklerose) nicht exprimieren konnten, reagierten MOG-spezifische T-Zellen mit NF-M kreuz und induzierten so überraschenderweise eine experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (Krishnamoorthy et al. 2009). Eine Beteiligung der Augen bei der Entzündung wurde in dieser Studie nicht speziell erwähnt, allerdings zeigten sich bei einigen der Versuchstiere zelluläre Infiltrationen sowie eine Demyelinisierung im Bereich des Nervus opticus (Krishnamoorthy et al. 2009). Zwar ist die Übertragbarkeit dieser Studie auf die ERU unklar, sie zeigt aber auf, dass eine Autoaggressivität gegen NF-M schwerwiegende Auswirkungen haben kann. Autoreaktivität gegen NF-M ist auch bei Patienten mit Multipler Sklerose beschrieben, und zwar in der Form von intrathekalen Autoantikörperproduktion gegen NF-M (Bartos et al. 2007). Es konnte eine dauerhaft erhöhte intrathekale Produktion von NF-M spezifischen Autoantikörpern nachgewiesen werden, die deshalb als Biomarker für das Vorliegen von Neurodegeneration vorgeschlagen wurde (Bartos et al. 2007). Zwar konnte innerhalb der Gruppe von Patienten mit Multipler Sklerose keine besondere

Korrelation der intrathekalen anti-NF-M-Reaktivität mit einer speziellen klinischen Symptomatik oder Schwere der Erkrankung gefunden werden, allerdings könnte eine intrathekale Reaktion gegen NF-M als Marker für das Vorhandensein einer axonalen Pathologie an sich dienen (Bartos et al. 2007). Interessanterweise zeichnete sich bei diesen Patienten auch ab, dass bei der IgM- und IgG-Reaktion gegen NF-M im Serum kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit Multipler Sklerose, gesunden Kontrollspendern und Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen festgestellt werden konnte, sondern dass tatsächlich die intrathekale Reaktion den Ausschlag gab (Bartos et al. 2007). Des Weiteren gab es bei den einzelnen Patienten keine Korrelation zwischen den NF-M-spezifischen Autoantikörpern im Serum und denen im Liquor, so dass es nicht möglich war, aus der Serumantwort eines Patienten eine Antwort im Liquor abzuleiten (Bartos et al. 2007). Dies unterstreicht, wie wichtig es ist, auch anderes Material als Serum auf Autoreaktivitäten zu untersuchen, da es zwar viele Vorteile bietet, aber nicht immer die komplette Bandbreite an Informationen für organspezifische Autoimmunerkrankungen liefern kann. Anders als bei der Multiplen Sklerose sind bei der ERU aber axonale Anteile der Retina, wie zum Beispiel die Nervenfaserschicht, nur eine von mehreren betroffenen Strukturen (Deeg et al. 2002a). Auch finden sich bei der ERU inflammatorische Zellen in der Nervenfaserschicht nicht im frühesten Stadium ein, sondern erst, nachdem die Photorezeptorschicht weitgehend zerstört ist (Deeg et al. 2002a). Ein Verlust von Ganglienzellen ist erst in einem noch späteren Stadium zu beobachten (Deeg et al. 2002a). Das Vorhandensein einer Autoimmunreaktion auf NF-M könnte also bei der ERU anzeigen, dass die Erkrankung bereits fortgeschritten ist und dass eine Beschädigung NF-M exprimierender Strukturen schon erfolgt ist. Dies könnte hilfreich dabei sein, den Status quo eines Patienten oder die Prognose für das Sehvermögen zum Zeitpunkt der Vitrektomie besser einzuschätzen.

Neben der Erkenntnis, dass sehr viele ERU-Patienten (44%; Publikation, Abbildung 2) Autoantikörper gegen NF-M bilden und dass die retinale NF-M-Expression vermutlich in Folge dieser Autoimmunreaktion deutlich reduziert ist (Publikation, Abbildung 3B) konnte auch nachgewiesen werden, dass es intraokuläre IgM-Autoantikörper sind, die an retinales NF-M binden (Publikation, Abbildung 1). Es ist bekannt, dass bei an ERU erkrankten Tieren vermehrt intraokuläre IgG Antikörper auftreten (Deeg et al. 2001; Hauck et al. 2012), welche sich gegen retinale Proteine

richten (Deeg et al. 2001). Die Untersuchung des Vorhandenseins und der Spezifität einer intraokulären IgM-Antwort gegen retinale Proteine bei der ERU wurde nie zuvor untersucht und schließt somit eine wichtige Lücke. Da wir hier auch beobachten konnten, dass eine intraokuläre IgG-Reaktion gegen NF-M nur bei sehr wenigen Patienten auftrat (8%; Publikation, Abbildung 2), stellt sich nun die Frage, welche Bedeutung eine derartig IgM-dominierte Antwort im Zusammenhang mit der ERU haben könnte. IgM ist der erste Antikörper, der im Rahmen einer Immunantwort gebildet wird (Ehrenstein and Notley 2010). Zugleich wird IgM auch als der entwicklungsgeschichtlich älteste Immunglobulin-Isotyp angesehen, da er der einzige ist, der bei allen Vertebraten vorhanden ist (Ehrenstein and Notley 2010), selbst bei urtümlichen Organismen wie dem Axolotl (Fellah et al. 1992). Funktionell weisen IgM-Antikörper diverse Besonderheiten auf. Sie haben durch die bei der sezernierten Form vorherrschende Pentamer-Struktur eine hohe Avidität, die es ihnen erlaubt, mehrere Antigenstrukturen zugleich zu binden (Manson et al. 2005). In den letzten Jahren wurden zunehmend mehr unterschiedliche Funktionen von IgM erkannt, wie beispielsweise seine Bedeutung für die Beseitigung apoptotischer Zellen (Ehrenstein and Notley 2010). Die Bindung des Komplementmoleküls C1q an apoptotische Zellen führte in der Präsenz von IgM dazu, dass C3 auf diesen Zellen deponiert wird, was wiederum eine Phagozytose durch Makrophagen vermittelt (Kim et al. 2002; Ogden et al. 2005). Obwohl es noch eine Vielzahl anderer Moleküle gibt, die an der Beseitigung apoptotischer Zellen über Phagozytose beteiligt sind, ist IgM ein Faktor, der offenbar wesentlich zur Effizienz dieses Systems beiträgt (Quartier et al. 2005). Mäuse, bei denen die Beseitigung apoptotischer Zellen aufgrund eines Mangels an Serum-IgM behindert ist, entwickeln interessanterweise eine systemische Autoimmunität gegen zelluläre Bestandteile, die sich in Lupus-Erythematodes-ähnlichen Symptomen zeigt (Boes et al. 2000; Ehrenstein et al. 2000). Im Rahmen von Autoimmunkrankheiten des Menschen können antigenspezifische IgM offenbar auch eine protektive Wirkung haben (Gronwall et al. 2012). So ist bei Patienten mit systemischem Lupus Erythematodes ein signifikant höherer Serumgehalt an IgM gegen das Apoptose-assoziierte Antigen Phosphorylcholin mit niedriger Krankheitsintensität, einem niedrigen Grad an Organschädigung und der Abwesenheit von kardiovaskulären Komplikationen assoziiert, während IgM gegen Cardiolipin und dsDNA bei Patienten signifikant erhöht waren, bei denen eine renale Beteiligung ausblieb (Gronwall et al. 2012). Könnte es also möglich sein, dass die

intraokuläre Reaktion bei ERU gegen NF-M nicht schädlich ist, sondern eine protektive Funktion hat? Indizien wie die reduzierte retinale Expression von NF-M (Publikation, Abbildung 3B) sprechen dagegen, außerdem muss man davon ausgehen, dass mögliche protektive Funktionen von IgM in der Summe von pro-inflammatorischen Faktoren überrollt werden, da die Schädigung der Retina bei der ERU progressiv ist (Deeg et al. 2002a). Das wichtigste Gegenargument ist aber, dass sich physiologischerweise keine Antikörper im Augeninneren befinden (Deeg et al. 2007a). Dies macht überaus unwahrscheinlich, dass autoreaktive IgM in diesem Organ zu einem protektivem Zweck vorliegen, da die Präsenz von Antikörpern im Auge ein pathologischer Zustand ist. Die Untersuchung einer Korrelation zwischen intraokulären IgM und einer eventuell milderer Ausprägung klinischer Symptome könnte diese Frage im Idealfall beantworten. Eine Schwierigkeit könnte jedoch hierbei sein, dass vor einer Auswertung der Faktor „Schweregrad“ genau definiert werden müsste, da es bei der ERU im Moment kein fest definiertes System gibt, dass den Schweregrad erfasst. Verschiede Aspekte des Krankheitsverlaufes könnten zu einer Einschätzung oder Definition des Schweregrads beitragen. Einige Beispiele hierfür wären: Wie stark ist der Funktionsverlust in einem bestimmten Zeitraum? Wie lange dauern akute Schübe an? Sind sie schmerzhaft? Wie lang ist die Zeit zwischen akuten Schüben? Solche unterschiedlichen Aspekte, die alle Teil des Oberbegriffs „Schweregrad“ sein könnten, könnten auch jeweils individuell im Zusammenhang mit IgM analysiert werden. Um eine protektive Wirkung von autoreaktiven IgM nachzuweisen, müssten aber Patienten über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. Doch abgesehen von einigen protektiven Funktionen haben IgM-Antikörper auch Eigenschaften, die sich vor allem bei Autoimmunkrankheiten auch negativ für den Organismus auswirken können. IgM haben eine im Vergleich zu IgG-Antikörpern 1000-fach höhere Affinität zu C1q, was IgM zu einem hoch potenten Aktivator der Komplementkaskade macht (Ehrenstein and Notley 2010). Komplement liegt physiologischerweise in der Retina vor, wird aber durch das anti-inflammatorische Milieu im Auge streng kontrolliert (Sohn et al. 2000). Bei der ERU hingegen kommt es zu einer Komplement-Aktivierung, sowohl im Blut (Zipplies et al. 2010a) als auch lokal auf eingewanderten Leukozyten in der Retina (Zipplies et al. 2010b). Bei der EAU konnte eine positive Korrelation zwischen der Komplementaktivierung und dem Schweregrad des Krankheitsverlauf gezeigt werden (Copland et al. 2010). Die Komplementkaskade spielt offensichtlich eine so wichtige Rolle bei der

Uveitispathogenese, dass Komplementinhibitoren eine Entstehung von experimenteller autoimmuner anteriorer Uveitis bei der Ratte unterdrücken konnten (Manickam et al. 2010; Manickam et al. 2011).

Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die IgM-Reaktion auf NF-M bei der ERU einen wesentlichen Beitrag zur Zerstörung des Retinagewebes leistet. In der Tat gibt es Berichte darüber, dass autoreaktive IgM den Verlauf von Autoimmunkrankheiten negativ beeinflussen können und deshalb sogar als prognostischer Marker nützlich sind (Villar et al. 2003). So beispielsweise bei Multipler Sklerose, wo schon seit längerem bekannt ist, dass das Auftreten von Myelin-lipid-spezifischen IgM-Autoantikörpern im Liquor von Patienten prognostisch für einen besonders schweren Verlauf ist (Villar et al. 2003). Dieses Beispiel aus der Humanmedizin zeigt auf, wie wichtig es ist, bei einer Autoimmunerkrankung möglichst das gesamte Spektrum beteiligter immunologischer Strukturen zu kennen und sich nicht nur auf die Untersuchung von IgG-Reaktionen zu beschränken. Die Herangehensweise in der vorliegenden Dissertation, die intraokuläre IgM-Antwort spezifisch zu untersuchen, wurde durch den Befund einer vorher unbekannten Spezifität mit einer IgM-dominierten Immunantwort bestätigt. Der Vergleich der vitrealen IgM und IgG-Reaktionen in der gleichen Kohorte brachte ein überraschendes Ergebnis. Trotz der hohen Prävalenz von IgM-Reaktionen (44%; Publikation, Abbildung 2) war der Anteil an ERU-Proben, die eine IgG-Antwort gegen NF-M aufwiesen, nur sehr gering (8%; Publikation, Abbildung 2). Da aus früheren Studien bekannt war, dass intraokuläre IgG-Antikörper anderer Spezifität sehr häufig in Glaskörperproben von ERU Patienten vorkommen (Deeg et al. 2001), kann ausgeschlossen werden, dass diese Diskrepanz zwischen IgM und IgG durch einen absoluten Mangel an intraokulären IgG bei ERU Proben verursacht wird. Auch konnte in einem Versuch mit identischem Aufbau, bei dem das Antigen allerdings nicht NF-M, sondern die leichte Untereinheit NF-L war, keine Reaktion beobachtet werden. Dies bestätigt, dass intraokuläre IgM spezifisch an NF-M binden und dass im ELISA nicht unspezifisch der Gesamtgehalt an intraokulärem IgM gemessen wurde. Somit ist die hohe Prävalenz der IgM-Reaktion im Vergleich zu einer kaum vorhandenen IgG Reaktion eine spezifische Eigenschaft der intraokulären Autoimmunantwort auf NF-M. Die Patienten-Proben waren nicht besonders vorselektiert, sondern sollten einen breiten Querschnitt von ERU-Patienten in ganz unterschiedlichen Krankheitsstadien repräsentieren. Auch wurden die ERU-Proben durchweg mittels Vitrektomie gewonnen und dieser Eingriff

wird nicht während der akuten Entzündungsschübe, sondern in der ruhenden Phase der Remission durchgeführt. Dass die IgM-Antwort trotz dieser beiden Faktoren eine so hohe Prävalenz hat, legt ebenfalls nahe, dass es sich bei der intraokulären Antwort auf NF-M um eine IgM-dominierte Reaktion handelt, die über einen längeren Zeitraum persistiert. Da pro getestetem ERU-Patienten jeweils nur eine einzelne intraokuläre Probe vorlag, konnte in dieser Studie nicht untersucht werden, über welchen Zeitraum im Verlauf der Krankheit die IgM-Antwort bestehen bleibt. Zur Beantwortung dieser Frage müssten über einen längeren Zeitraum sukzessive intraokuläre Proben von ERU-Patienten gewonnen und deren IgM-Reaktivität gegen NF-M getestet werden. In der Praxis würde sich eine solche Vorgehensweise jedoch als sehr problematisch erweisen, da die intraokulären Proben der ERU-Patienten in dieser Studie, wie bereits erwähnt, durch Vitrektomie gewonnen wurden. Die Vitrektomie ist wiederum ein therapeutischer Eingriff, der darauf abzielt, möglichst den gesamten Glaskörper zu entfernen und zu substituieren (Werry and Gerhards 1992). Daher ist bei ERU-Patienten eine gezielte Gewinnung von intraokulärem Probenmaterial zu verschiedenen Zeitpunkten nicht möglich. Allerdings wurde bei Patienten mit Multipler Sklerose bereits eine persistierende IgM-Reaktion auf NF-M beschrieben (Bartos et al. 2007). Hier zeigte sich, dass auch bei wiederholter Probennahme das Verhältnis von NF-M spezifischen IgM zu IgG im Liquor konstant blieb, oder anders ausgedrückt, dass die IgM Reaktion konstant neben der IgG Reaktion bestehen blieb und nicht mit der Zeit abnahm, wie man es erwarten würde (Bartos et al. 2007). Die Autoren folgerten deshalb, dass ein vollständiger Switch von IgM auf IgG in diesem Fall nicht stattfindet und nannten als einen möglichen Grund dafür die ständige Präsenz des Antigens (Bartos et al. 2007). Doch da S-Antigen, IRBP und CRALBP bei der ERU auch ständig exprimiert bleiben (Deeg et al. 2007b) und es dennoch zu einer intraokulären IgG-Antwort gegen diese Antigene kommt (Deeg et al. 2001; Deeg et al. 2006b), ist die IgM-Dominanz bei der Immunantwort gegen NF-M nicht oder nicht ausschließlich mit einem solchen Mechanismus zu erklären. Als eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die IgM-Persistenz bei Multiple-Sklerose-Patienten wurde angeführt, dass bei intrathekalen Immunreaktionen eine vollständige Umschaltung von IgM- auf IgG-Antwort generell in vielen Fällen ausbleibt (Reiber and Peter 2001; Bartos et al. 2007). Bei der ERU gilt dies offensichtlich nicht für die Autoantigene S-Antigen, IRBP und CRALBP (Deeg et al. 2001; Deeg et al. 2006b), aber offensichtlich für NF-M (Publikation, Abbildung 2).

Intraokuläre IgM targetieren außer NF-M noch eine große Bandbreite weiterer Autoantigene, wobei sich kein weiteres Autoantigen als häufige Zielstruktur herausstellte (Zipplies et al. 2012).

Ein überaus wichtiger weiterer Schritt bei der Erforschung der Rolle von NF-M als Autoantigen bei der ERU ist die Frage, ob die Antikörper lokal oder systemisch produziert wurden. Unter den Zellen, die die Retina bei ERU infiltrieren, befinden sich auch B-Zellen (Deeg et al. 2002a). Eine fehlende Korrelation zwischen intraokulärer und peripherer anti NF-M Immunantwort könnte daher ein Hinweis darauf sein, dass bei der ERU durch diese B-Zellen eine lokale Produktion von Autoantikörpern stattfindet. Die Anwesenheit von B-Zellen in der uveitischen Retina könnte sogar noch eine weitere mögliche Erklärung für die IgM-dominierte Reaktion auf NF-M liefern. Es könnte sich dabei um eine T-Zell-unabhängige Antwort (engl. thymus-independent, TI) handeln (Mond et al. 1995). Persistierende IgM-Antworten können durch sogenannte TI-Antigene der Klasse 2 (TI-2) ausgelöst werden (Mond et al. 1995; Heimbürg-Molinaro and Rittenhouse-Olson 2009). Antigene, die unter die TI-2 Kategorie fallen, können B-Lymphozyten direkt aktivieren, indem sie die IgM-Rezeptoren auf deren Oberfläche quervernetzen (Vos et al. 2000). TI-2 Antigene sind dabei nicht starr definiert, sondern sind eine heterogene Gruppe, bei der sich aber gewisse Gemeinsamkeiten bei der Molekularstruktur feststellen lassen, wie beispielsweise eine repetitive Struktur oder Kohlenhydratreste, als Prototyp gelten Polysaccharidantigene oder Flagellen von Bakterien (Mond et al. 1995; Vos et al. 2000; Heimbürg-Molinaro and Rittenhouse-Olson 2009). Die strukturellen Eigenschaften von NF-M könnten deshalb dazu führen, dass es eine TI-2 Reaktion hervorrufen kann. So bietet es durch die Polymerstruktur, zu der sich Neurofilamente zusammenlagern (Perrot et al. 2008), sich wiederholende, repetitive Strukturen an. Auch gibt es innerhalb des NF-M-Moleküls eine repetitive Aminosäuresequenz (Barry et al. 2010) und zudem ist es glykosyliert (Deng et al. 2008; Barry et al. 2010). NF-M hat also gleich mehrere Merkmale, die Kriterien für TI-2-Antigene entsprechen (Mond et al. 1995). Die mit einer Flaschenbürste verglichene Gestalt der Neurofilament-Polymere, bei der die Schwanzdomänen von NF-M und NF-H als Verbindungsstelle zu angrenzenden Neurofilament-Strängen oder anderen zellulären Strukturen aus dem Kernstrang nach außen ragen (Hisanaga and Hirokawa 1988; Hisanaga et al. 1990; Tong et al. 1999), könnte dazu beitragen, dass NF-M einwandernden B-Zellen gegenüber besonders exponiert ist. Dafür könnte auch

sprechen, dass wir gegen NF-L, das sich eher geschützt im Kernstrang der Filamente befindet (Hisanaga and Hirokawa 1988; Hisanaga et al. 1990; Tong et al. 1999), im Vergleich keine intraokuläre Reaktion nachweisen konnten. Die Hypothese, ob NF-M eine TI-2 Antwort hervorrufen kann, könnte durch einen Versuch, B-Lymphozyten mit NF-M zu stimulieren, auf die Probe gestellt werden. Würden zum Beispiel isolierte B-Lymphozyten ohne die Anwesenheit von T-Zellen auf eine Stimulation durch NF-M mit Proliferation reagieren, könnte dies als Hinweis auf TI-Eigenschaften von NF-M als Antigen gewertet werden. Auch eine nähere Charakterisierung der intraokulären B-Zellen bei der ERU (Deeg et al. 2002a) könnte sich in Zukunft bei der Beantwortung dieser Frage als hilfreich erweisen, da es einen speziellen Subtyp von B-Zellen gibt, der bevorzugt auf TI-Antigene reagiert, nämlich die sogenannten B1-Zellen (Duarte-Rey et al. 2012). Beim Menschen sind diese Zellen bisher als $CD20^+CD27^+CD43^+CD70^-$ charakterisiert worden (Griffin et al. 2011; Duarte-Rey et al. 2012). Mittels Vitrektomie lassen sich von ERU-Patienten intraokuläre Zellen in ausreichender Menge für eine Charakterisierung mittels Durchflußzytometrie gewinnen (Deeg et al. 2001). Doch obwohl der Zugang zu Probenmaterial gesichert ist, besteht derzeit noch ein Mangel an Grundlagenwissen über B-Zellen des Pferdes und über B-Zell-Funktionen im Allgemeinen. So ist zum Beispiel noch unbekannt, ob das Pferd auch B1-Zellen besitzt, auch fehlt es an B-Zell-spezifischen Reagenzien für das Pferd. Der Mangel an Pferde-spezifischen Reagenzien betrifft jedoch nicht nur B-Zellen. Es besteht insgesamt ein großer Bedarf für Grundlagenforschung, die sich mit dem Immunsystem des Pferdes beschäftigt und gleichzeitig auch ein Bedarf für die stetige Etablierung von Werkzeugen, die bei der Untersuchung helfen. Daher ist beispielsweise eines der aktuellen Projekte unserer Forschungsgruppe die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Immunglobulin-Isotypen des Pferdes, die hoffentlich in der Zukunft dazu beitragen werden, eine Isotyp-Spezifität von IgG-Reaktionen bei ERU zu charakterisieren.

Die Bestätigung einer TI-2 Antwort auf NF-M wäre ein sehr interessanter Befund, da dies den bisher eher wenig beachteten B-Zellen eine neue Bedeutung bei der Uveitis-Pathogenese bei Pferd und Mensch verleihen würde, auch wenn sich herausstellen sollte, dass die Reaktion nicht lokal entsteht, sondern aus der Peripherie kommt. Der Nachweis einer parallelen anti-NF-M Reaktion im Serum könnte sich sogar als sehr nützlich für spätere Studien herausstellen, da Serum mit

wesentlich geringerem Aufwand gewonnen werden kann als intraokuläres Material. Da sich Serum zudem problemlos wiederholt gewinnen lässt, wäre das insbesondere dann entscheidend, falls sich in zukünftigen Studien anti-NF-M Antikörper als ERU-Biomarker herausstellen sollten. Es wären Biomarker wünschenswert, mit denen man Tiere, die gefährdet sind, im späteren Leben eine ERU zu entwickeln, vorher erkennen könnte. Teilweise sind Biomarker-Autoantikörper schon lange Zeit vor dem Auftreten von Symptomen einer Krankheit nachweisbar, wie eine retrospektive Studie aus den Vereinigten Staaten von Amerika zeigte, die Aufzeichnungen aus Militärkrankenhäusern auswertete (Heinlen et al. 2007). Von 130 Angestellten des Militärs, die Systemischen Lupus Erythematoses entwickelt hatten, wurden rückblickend sowohl die medizinische Akte als auch Serumproben untersucht, welche vor der Diagnose genommen worden waren. Es zeigte sich, dass bei den meisten Patienten mit renaler Beteiligung die damit assoziierten Autoantikörper gegen dsDNA und C1q präsent waren, lange bevor sich klinische Symptome zeigten (Heinlen et al. 2007). Übertragen auf die ERU bedeutet dieses Beispiel, dass auch hier über die Untersuchung von Autoantikörpern prognostische Marker gefunden werden könnten, welche eine Früherkennung von gefährdeten Tieren erlauben. Eine solche Früherkennung, deren Etablierung allerdings die Beobachtung einer sehr großen Kohorte von Pferden und eine regelmäßige Entnahme von Blut erfordern würde, könnte eines Tages dazu beitragen, schon frühzeitig modulierend auf die Erkrankung einzuwirken und so die Prognose für ein betroffenes Pferd zu optimieren. Die Rolle als Biomarker für NF-M wäre hierbei als weitgehend unabhängig von einer Uveitogenität oder pathologischen Relevanz zu sehen, da Autoantikörper, die als Biomarker nutzbar sind, nicht immer pathogenetisch relevant sind (Thrower and Bingley 2011). So sind die vier am besten etablierten prognostischen Biomarker-Autoantikörper bei Typ I Diabetes gegen Insulin (IAA), Glutamat-decarboxylase 65 (GADA), Tyrosinphosphatase-IA 2 (IA2A) und Inselzellen (ICA) gerichtet (Thrower and Bingley 2011). Nur einer dieser Antikörper richtet sich überhaupt gegen ein Antigen, das exklusiv auf beta-Inselzellen exprimiert wird, nämlich Insulin (Wasserfall and Atkinson 2006). Da diese Antikörper Jahre vor dem Auftauchen klinischer Symptome präsent sein können, offensichtlich also nicht unmittelbar zur Zerstörung von beta-Inselzellen führen und da zum Beispiel Patienten mit hohen GADA-Titern sogar eher eine langsame Progression zeigten (Gardner et al. 1999), ist ein direkter Beitrag zur Pathogenese dieser Biomarker fraglich. Um Biomarker bei der ERU zu

etablieren, müssten bekannte Autoantigene auf ihren prognostischen oder prädiktiven Wert hin geprüft werden. Für den Fall, das keines der bekannten Autoantigene prognostischen oder prädiktiven Wert hat, sollte auch weiterhin nach neuen Autoreaktionen, die einen prognostisch-prädiktiven Wert haben könnten, gezielt gesucht werden.

Biomarker gehören zum Konzept der personalisierten Medizin, also dem Grundgedanken, dass Medizin bei der Behandlung von Krankheiten sozusagen maßgeschneidert angepasst werden sollte auf den Patienten (Henney 2012). Der große Fortschritt bei biowissenschaftlichen Technologien, insbesondere die Entschlüsselung des menschlichen Genoms, hatte in dieser Hinsicht eine große Euphorie zur Folge. Doch obwohl inzwischen bei sehr vielen Krankheiten Pathomechanismen bis ins molekulare Detail charakterisiert werden können, ist es bisher noch nicht gelungen, diesen immensen Zuwachs an Wissen auch in großem Rahmen in der Anwendung in der alltäglichen Praxis zu übernehmen (Dammann and Weber 2012; Louca 2012). Der Schritt von einer weitgehend reaktiven Art Medizin, die erst nach der Diagnose einer manifesten Erkrankung eingreift, hin zu einer umfassend prädiktiven und präventiven Strategie, mit der das Schlagwort der personalisierten Medizin oft in Verbindung gebracht wird, ist ebenfalls noch in weiter Ferne (Henney 2012). Als einer der Gründe dafür gilt unser zwar enorm gewachsenes, aber immer noch sehr unvollständiges Wissen über pathophysiologische Zusammenhänge, insbesondere bei komplexen, multifaktoriellen Erkrankungen (Henney 2012).

Die ERU lässt sich ganz zweifellos zu diesen komplexen Erkrankungen zählen, nicht zuletzt da sie sehr viele unterschiedliche klinische Ausprägungen unter derzeit einem Begriff in sich vereint (Spiess 2010). In der Humanmedizin versucht man seit Jahrzehnten (Rosenbaum and Nozik 1985) den unterschiedlichen Ausprägungen von Uveitis durch die Anpassung der Nomenklatur und einer Klassifizierung nach anatomischen Gesichtspunkten und Schwere der Entzündung gerecht zu werden (Khairallah 2010). Bei autoimmuner Uveitis des Menschen gibt es unterschiedliche Arten, die sich jeweils anhand klinischer Manifestationen im Auge selbst oder gleichzeitig auftretender Symptome an anderen Organen unterscheiden lassen, wie zum Beispiel das Vogt-Koyanagi-Harada-Syndrom, die juvenile idiopathische Arthritis oder die Behcet'sche Erkrankung (Levy et al. 2011). Bei ERU sind außer einer begleitenden Pinealitis, die wahrscheinlich auf der Expression der retinalen

Autoantigene im Pinealorgan beruht (Kalsow et al. 1992; Kalsow et al. 1993; Kalsow et al. 1999), im Moment keine korrelierten Symptome an anderen Organen bekannt. Doch eine Differenzierung verschiedener ERU-Varianten oder Schweregrade könnte in der Zukunft vielleicht über das Antigenspektrum erfolgen. Bei der Reaktion gegen NF-M zeigte sich, dass es trotz einer hohen Prävalenz (44 %, Publikation, Abbildung 2) auch ERU-Patienten gibt, die nicht auf NF-M reagierten. Dies ist jedoch nur eine Momentaufnahme. Es könnte sein, dass diese Patienten in einem anderen Stadium sind als die positiven Probanden und die Reaktion später entwickeln, oder dass die Reaktion bei diesen Patienten schon abgeklungen ist. Es könnte aber auch sein, dass diese Tiere die Reaktion nie entwickeln und die Krankheit einen ganz anderen Verlauf nimmt oder aber einen anderen initiiierenden Faktor hat und eines Tages zum Beispiel als ERU anti-NF-M-negativer-Typ bezeichnet wird. Solche Überlegungen sind natürlich nur spekulativ, doch sie sollen aufzeigen, dass die Identifikation von NF-M als Autoantigen und der immunologische Zusammenhang, in dem die Autoimmunreaktion beobachtet wurde, weiterer Forschung bedürfen und dass die Tatsache, dass nicht alle Patienten auf ein bestimmtes Autoantigen reagieren, eine Entdeckung nicht weniger bedeutsam macht. Auch wird es in der Zukunft notwendig sein, Reaktionen gegen Autoantigene nicht isoliert zu betrachten, sondern miteinander in Beziehung zu setzen. Notwendig wäre hierfür eine Meta-Analyse, die untersucht, ob beispielsweise eine Reaktion gegen Antigen A immer mit einer Reaktion gegen Antigen B gemeinsam auftritt, aber nie mit einer Reaktion gegen Antigen C. Oder aber dass gleichzeitige Reaktionen gegen Antigen A und C eine besonders schwere Form der ERU verursachen. Eine derartige Meta-Analyse könnte einen Beitrag dazu leisten, die Informationen, die in den Autoreaktivitäten als Spiegel der Erkrankung stecken, in größerem Umfang als bisher zu nutzen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es mit dem hier gewählten Ansatz gelungen ist, ein vorher nicht bekanntes ERU-Autoantigen zu identifizieren, bei dem interessanterweise eine intraokuläre IgM Antwort auftritt. Für die Beurteilung der Relevanz der anti-NF-M-Autoreaktivität bei der ERU für die Pathogenese oder als prädiktiver Marker sind weitere Experimente nötig, die jetzt angegangen werden. Da NF-M im Zusammenhang mit der autoimmunen Uveitis des Menschen noch nicht beschrieben wurde, sich aber schon in der Vergangenheit mit CRALBP ein neues ERU-Autoantigen (Deeg et al. 2006b) als relevant für die Autoimmunuveitis des Menschen erwiesen hat, wird in Kooperation mit der Humanmedizin ein Vorkommen

von anti-NF-M-Autoantikörpern auch bei dieser Erkrankung überprüft (Deeg et al. 2007b).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die equine rezidivierende Uveitis (ERU) ist eine entzündliche, autoimmun-medierte Augenerkrankung bei Pferden, die im Endstadium zur Erblindung führt. Unter verschiedenen Namen ist sie seit Jahrhunderten bekannt und mit einer Prävalenz von etwa 10% weltweit einer der häufigsten Gründe für eine Erblindung bei Pferden. Die Bedeutung der ERU ist aber nicht nur auf den veterinärmedizinischen Bereich beschränkt, da sie auch als Modell für die autoimmune Uveitis des Menschen eingesetzt wird. Für die Erkrankung des Menschen ist die ERU das einzige spontane Tiermodell. Charakteristisch für die ERU sind spontan auftretende und wieder abklingende Entzündungsschübe, in deren Verlauf die Retina als Zielgewebe progressiv geschädigt wird. Verschiedene Proteine der Retina konnten in den letzten Jahren schon als Autoantigene identifiziert werden, darunter Interphotorezeptor Retinoid bindendes Protein (IRBP), S-Antigen, Recoverin und Zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein (CRALBP). Um aber die Pathogenesemechanismen der ERU in ihrer ganzen Komplexität verstehen zu können, ist ein möglichst vollständiges Wissen über das ganze Autoantigenspektrum nötig. Deshalb ist es wichtig, nach neuen, bisher unentdeckten Autoantigenen zu suchen und diese zu identifizieren. Im Rahmen dieser Dissertation sollte deshalb zum einen die Frage geklärt werden, ob die Spezifität intraokulärer Autoantikörper über das bereits bekannte Spektrum hinausgeht und ob möglicherweise andere, bisher nicht entdeckte retinale Autoantigene gebunden werden. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Spezifität autoreaktiver, intraokulärer IgM-Antikörper zu untersuchen, die bisher im Rahmen der ERU Forschung noch nie charakterisiert wurde. Autoreaktive IgM könnten besonders im Zusammenhang mit inter- und intramolekularem Epitop-Spreading, das bei der ERU beschrieben ist, interessant sein. Hierbei kommt es im Verlauf der Erkrankung zu einer Veränderung des targetierten Autoantigenspektrums. Die Abklärung der Spezifität intraokulärer IgM könnte dazu beitragen, zukünftige Zielstrukturen frühzeitig zu erkennen.

Um potenzielle Autoantigene zu identifizieren, die von intraokulären IgM Antikörpern targetiert werden, wurde zunächst das Bindungsmuster auf dem retinalen Proteom mit 2D Western Blots untersucht. Während bei Proben augengesunder Tiere keine Reaktionen auftraten, zeigte sich bei Proben, die von ERU-Patienten stammten, dass innerhalb eines insgesamt großen Spektrums verschiedener Reaktionen ein Protein-

Spot sehr häufig gebunden wurde. Mittels Massenspektrometrie konnte dieses Protein als Neurofilament-M (NF-M) identifiziert werden. Im ELISA konnte die NF-M Spezifität intraokulärer IgM bestätigt werden, zudem wurde für die ERU-Gruppe eine Prävalenz von 44% ermittelt. Die Prävalenz für intraokuläre IgG der gleichen Spezifität war ungleich niedriger, sie lag bei 8% bei ERU. Kontrollproben augengesunder Pferde zeigten hingegen keinerlei Reaktion auf NF-M. Der große Unterschied in der Prävalenz von IgM und IgG weist darauf hin, dass die Autoimmunantwort auf NF-M wahrscheinlich eine persistierende IgM-Reaktion ist. Im physiologischen Zustand wird NF-M im Pferdeauge vor allem von retinalen Ganglienzellen und ihren Fortsätzen exprimiert, sowie von Horizontalzellen. Dagegen konnte bei 89% der ERU-Retinae eine deutliche Reduktion des NF-M-Signals festgestellt werden. Gründe dafür könnten eine Herunterregulierung von NF-M als zelluläre Reaktion auf Stress sein oder aber eine Zerstörung NF-M exprimierender Strukturen im Zuge einer Autoimmunreaktion auf das Protein.

Die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass das Antigenspektrum bei der ERU über das bisher bekannte hinausgeht und dass auch weiterhin nach neuen Autoantigenen gesucht werden sollte. Die IgM-dominierte Reaktion auf das neu identifizierte Autoantigen, NF-M, zeigt zudem auf, dass das Bindungsspektrum von intraokulären IgM-Autoantikörpern sich nicht immer mit dem von intraokulären IgG überschneidet und deshalb eine gesonderte Betrachtung verdient. Die Persistenz der IgM Antwort gegen NF-M muss in zukünftigen Studien geprüft und ihre Gründe beleuchtet werden, da es sich hierbei um eine T-Zell-unabhängige Reaktion handeln könnte, was bei der Immunpathologie der ERU auf eine wichtige Rolle auch für B-Lymphozyten hinweisen würde. Da bei ERU-Patienten die Prävalenz der intraokulären IgM-Reaktion gegen NF-M hoch ist, sollten weiterführende Studien darauf abzielen, eine pathogenetische Relevanz von NF-M als Autoantigen bei ERU und autoimmuner Uveitis des Menschen abzuklären und nach einer Charakterisierung der Serumantwort auf NF-M auch eine Rolle als potenzieller Biomarker zu prüfen.

6 SUMMARY

6.1. Analysis of binding specificity and identification of target proteins of intraocular IgM antibodies in equine recurrent uveitis

Equine recurrent uveitis (ERU) is an inflammatory, autoimmune-mediated ophthalmologic disease in horses, leading to blindness in its final stage. Significance of ERU is not limited to veterinary medicine, as it also serves as model for human autoimmune uveitis. ERU is the only spontaneous animal model for the human counterpart of the disease. ERU is characterized by episodes of spontaneously occurring and remitting episodes of inflammation resulting in progressive destruction of the target tissue retina. Over the last years, several retinal proteins were identified as autoantigens, among them Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP), S-Antigen, Recoverin and Cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP). However, in order to understand pathogenetic mechanisms of ERU in their full complexity, a comprehensive knowledge about the autoantigen spectrum is necessary. Thus, the search for and identification of novel, previously undetected antigens is crucial. Accordingly, one of the aims of this thesis was to answer the question if the specificity of intraocular autoantibody exceeds the established spectrum and if additional, previously undetected retinal autoantigens might be detected. An additional aim of this study was to analyze the specificity of intraocular autoreactive IgM antibodies, which was never characterized before in ERU research. Autoreactive IgM could be of special interest in the context of inter- and intramolecular epitope spreading, which was previously described in ERU. This process leads to a shift in the targeted antigen spectrum during the course of disease. An examination of intraocular IgM specificity could contribute to an early detection of future target structures.

In order to identify potential autoantigens targeted by intraocular IgM, their binding pattern on the retinal proteome was analyzed by 2D Western blot. While eye-healthy control samples did not show any reaction, for ERU samples it was revealed that, being part of a generally broad spectrum of different reactivities, one protein spot was bound repeatedly. Via mass spectrometry, this protein was identified as Neurofilament-M (NF-M). The NF-M specificity of intraocular IgM was validated by ELISA and a prevalence of 44% in the ERU group was determined. In contrast, the prevalence of intraocular IgG with the same specificity was much lower, with only 8%

in the ERU group. Control samples derived from eye-healthy horses did not show any reaction to NF-M. The striking difference in IgM and IgG prevalences points to a persistent IgM reaction in the autoimmune response to NF-M. In the physiological state, NF-M is mainly expressed by retinal ganglion cells and horizontal cells in the equine eye. Contrarily, a clear reduction of NF-M staining was detected in 89% of ERU retinæ. Reasons could be a downregulation of NF-M during a cellular stress reaction or a destruction of NF-M expressing ocular structures caused by an autoimmune response towards the protein.

Results obtained in this study demonstrate that the autoantigen spectrum in ERU exceeds the previously established ones, and that the search for further novel autoantigens should be continued. The IgM dominated reaction towards the novel autoantigen NF-M further points to the fact that the binding spectrum of intraocular IgM does not always overlap with intraocular IgG and thus deserves an individual examination. In future studies, persistence of IgM in the response to NF-M needs to be verified in and its reasons elucidated as it might represent a T-cell independent reaction, which would point to B-Lymphocytes also having an important role in ERU immunopathology. As the prevalence of an intraocular IgM reaction against NF-M is high in the ERU group, future studies should aim at a clarification of pathogenic relevance of NF-M as autoantigen in both, ERU and human autoimmune uveitis, and at investigating its role as potential biomarker.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abe, A, Numakura, C, Saito, K, Koide, H, Oka, N, Honma, A, Kishikawa, Y, Hayasaka, K. 2009. Neurofilament light chain polypeptide gene mutations in Charcot-Marie-Tooth disease: nonsense mutation probably causes a recessive phenotype. *J Hum Genet* **54**: 94-97.
- Agarwal, RK, Caspi, RR. 2004. Rodent models of experimental autoimmune uveitis. *Methods Mol Med* **102**: 395-419.
- Alard, JE, Hillion, S, Guillevin, L, Saraux, A, Pers, JO, Youinou, P, Jamin, C. 2011. Autoantibodies to endothelial cell surface ATP synthase, the endogenous receptor for hsp60, might play a pathogenic role in vasculitides. *PLoS One* **6**: doi:10.1371/journal.pone.0014654.
- Almon, RR, Andrew, CG, Appel, SH. 1974. Serum globulin in myasthenia gravis: inhibition of alpha-bungarotoxin binding to acetylcholine receptors. *Science* **186**: 55-57.
- Aronson, SB. 1965. The homoimmune uveitides in the guinea pig. *Ann N Y Acad Sci* **124**: 365-376.
- Balaratnasingam, C, Morgan, WH, Bass, L, Cringle, SJ, Yu, DY. 2008. Time-dependent effects of elevated intraocular pressure on optic nerve head axonal transport and cytoskeleton proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**: 986-999.
- Balaratnasingam, C, Morgan, WH, Bass, L, Kang, M, Cringle, SJ, Yu, DY. 2010. Time-dependent effects of focal retinal ischemia on axonal cytoskeleton proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**: 3019-3028.
- Balaratnasingam, C, Morgan, WH, Bass, L, Matich, G, Cringle, SJ, Yu, DY. 2007. Axonal transport and cytoskeletal changes in the laminar regions after elevated intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**: 3632-3644.
- Banares, A, Hernandez-Garcia, C, Fernandez-Gutierrez, B, Jover, JA. 1998. Eye involvement in the spondyloarthropathies. *Rheum Dis Clin North Am* **24**: 771-784, ix.
- Barker, JM, Barriga, KJ, Yu, L, Miao, D, Erlich, HA, Norris, JM, Eisenbarth, GS, Rewers, M. 2004. Prediction of autoantibody positivity and progression to type 1 diabetes: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *J Clin Endocrinol Metab* **89**: 3896-3902.
- Barnett, KC. 1987. Equine periodic ophthalmia: a continuing aetiological riddle. *Equine Vet J* **19**: 90-91.
- Barry, DM, Carpenter, C, Yager, C, Golik, B, Barry, KJ, Shen, H, Mikse, O, Eggert, LS, Schulz, DJ, Garcia, ML. 2010. Variation of the neurofilament medium KSP repeat sub-domain across mammalian species: implications for altering axonal structure. *J Exp Biol* **213**: 128-136.

- Bartos, A, Fialova, L, Soukupova, J, Kukal, J, Malbohan, I, Pit'ha, J. 2007. Elevated intrathecal antibodies against the medium neurofilament subunit in multiple sclerosis. *J Neurol* **254**: 20-25.
- Boehm, N, Wolters, D, Thiel, U, Lossbrand, U, Wiegel, N, Pfeiffer, N, Grus, FH. 2012. New insights into autoantibody profiles from immune privileged sites in the eye: a glaucoma study. *Brain Behav Immun* **26**: 96-102.
- Boes, M, Schmidt, T, Linkemann, K, Beaudette, BC, Marshak-Rothstein, A, Chen, J. 2000. Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 1184-1189.
- Bora, NS, Jha, P, Bora, PS. 2008. The role of complement in ocular pathology. *Semin Immunopathol* **30**: 85-95.
- Broekhuysse, RM, Winkens, HJ, Kuhlmann, ED. 1986. Induction of experimental autoimmune uveoretinitis and pinealitis by IRBP. Comparison to uveoretinitis induced by S-antigen and opsin. *Curr Eye Res* **5**: 231-240.
- Carbone, J, Sarmiento, E, Micheloud, D, Rodriguez-Mahou, M, Rodriguez-Molina, JJ, Cobo, R, Fernandez-Cruz, E. 2006. [Systemic autoimmune disease in patients with uveitis]. *Arch Soc Esp Oftalmol* **81**: 193-198.
- Caspi, RR. 1992. Immunogenetic aspects of clinical and experimental uveitis. *Reg Immunol* **4**: 321-330.
- Caspi, RR. 2003. Experimental autoimmune uveoretinitis in the rat and mouse. *Curr Protoc Immunol* **53**: 15.6.1–15.6.20. DOI: 10.1002/0471142735.im1506s53
- Caspi, RR. 2011. Understanding autoimmune uveitis through animal models. The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**: 1872-1879.
- Caspi, RR, Chan, CC, Fujino, Y, Oddo, S, Najafian, F, Bahmanyar, S, Heremans, H, Wilder, RL, Wiggert, B. 1992a. Genetic factors in susceptibility and resistance to experimental autoimmune uveoretinitis. *Curr Eye Res* **11 Suppl**: 81-86.
- Caspi, RR, Grubbs, BG, Chan, CC, Chader, GJ, Wiggert, B. 1992b. Genetic control of susceptibility to experimental autoimmune uveoretinitis in the mouse model. Concomitant regulation by MHC and non-MHC genes. *J Immunol* **148**: 2384-2389.
- Caspi, RR, Roberge, FG, Chan, CC, Wiggert, B, Chader, GJ, Rozenszajn, LA, Lando, Z, Nussenblatt, RB. 1988. A new model of autoimmune disease. Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens. *J Immunol* **140**: 1490-1495.
- Caspi, RR, Silver, PB, Luger, D, Tang, J, Cortes, LM, Pennesi, G, Mattapallil, MJ, Chan, CC. 2008. Mouse models of experimental autoimmune uveitis. *Ophthalmic Res* **40**: 169-174.
- Chaillous, L, Lefevre, H, Thivolet, C, Boitard, C, Lahlou, N, Atlan-Gepner, C, Bouhanick, B, Mogenet, A, Nicolino, M, Carel, JC, Lecomte, P, Marechaud, R,

- Bougneres, P, Charbonnel, B, Sai, P. 2000. Oral insulin administration and residual beta-cell function in recent-onset type 1 diabetes: a multicentre randomised controlled trial. *Diabetes* **49**: 545-549.
- Chan, CC, Nussenblatt, RB, Wiggert, B, Redmond, TM, Fujikawa, LS, Chader, GJ, Gery, I. 1987. Immunohistochemical analysis of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) in the rat. *Immunol Invest* **16**: 63-74.
- Clemente-Casares, X, Tsai, S, Huang, C, Santamaria, P. 2012. Antigen-specific therapeutic approaches in type 1 diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**: doi: 10.1101/cshperspect.a007773.
- Collin, JP, Mirshahi, M, Brisson, P, Falcon, J, Guerlotte, J, Faure, JP. 1986. Pineal-retinal molecular relationships: distribution of "S-antigen" in the pineal complex. *Neuroscience* **19**: 657-666.
- Cooper, GS, Stroehla, BC. 2003. The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* **2**: 119-125.
- Cooper, NR. 1985. The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Adv Immunol* **37**: 151-216.
- Copland, DA, Hussain, K, Baalasubramanian, S, Hughes, TR, Morgan, BP, Xu, H, Dick, AD, Nicholson, LB. 2010. Systemic and local anti-C5 therapy reduces the disease severity in experimental autoimmune uveoretinitis. *Clin Exp Immunol* **159**: 303-314.
- Dammann, M, Weber, F. 2012. Personalized medicine: caught between hope, hype and the real world. *Clinics (Sao Paulo)* **67 Suppl 1**: 91-97.
- Das, P, Abraham, R, David, C. 2000. HLA transgenic mice as models of human autoimmune diseases. *Rev Immunogenet* **2**: 105-114.
- de Kozak, Y, Sakai, J, Thillaye, B, Faure, JP. 1981. S antigen-induced experimental autoimmune uveo-retinitis in rats. *Curr Eye Res* **1**: 327-337.
- de Kozak, Y, Youn, WS, Bogossian, M, Faure, JP. 1976. Humoral and cellular immunity to retinal antigens in guinea pigs. *Mod Probl Ophthalmol* **16**: 51-58.
- de Smet, MD, Bitar, G, Mainigi, S, Nussenblatt, RB. 2001. Human S-antigen determinant recognition in uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**: 3233-3238.
- Deeg, CA, Altmann, F, Hauck, SM, Schoeffmann, S, Amann, B, Stangassinger, M, Ueffing, M. 2007a. Down-regulation of pigment epithelium-derived factor in uveitic lesion associates with focal vascular endothelial growth factor expression and breakdown of the blood-retinal barrier. *Proteomics* **7**: 1540-1548.
- Deeg, CA, Amann, B, Raith, AJ, Kaspers, B. 2006a. Inter- and intramolecular epitope spreading in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**: 652-656.

- Deeg, CA, Eberhardt, C, Hofmaier, F, Amann, B, Hauck, SM. 2011. Osteopontin and fibronectin levels are decreased in vitreous of autoimmune uveitis and retinal expression of both proteins indicates ECM re-modeling. *PLoS One* **6**: e27674.
- Deeg, CA, Ehrenhofer, M, Thureau, SR, Reese, S, Wildner, G, Kaspers, B. 2002a. Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses. *Exp Eye Res* **75**: 127-133.
- Deeg, CA, Hauck, SM, Amann, B, Pompetzki, D, Altmann, F, Raith, A, Schmalzl, T, Stangassinger, M, Ueffing, M. 2008. Equine recurrent uveitis--a spontaneous horse model of uveitis. *Ophthalmic Res* **40**: 151-153.
- Deeg, CA, Kaspers, B, Gerhards, H, Thureau, SR, Wollanke, B, Wildner, G. 2001. Immune responses to retinal autoantigens and peptides in equine recurrent uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**: 393-398.
- Deeg, CA, Pompetzki, D, Raith, AJ, Hauck, SM, Amann, B, Suppmann, S, Goebel, TW, Olazabal, U, Gerhards, H, Reese, S, Stangassinger, M, Kaspers, B, Ueffing, M. 2006b. Identification and functional validation of novel autoantigens in equine uveitis. *Mol Cell Proteomics* **5**: 1462-1470.
- Deeg, CA, Raith, AJ, Amann, B, Crabb, JW, Thureau, SR, Hauck, SM, Ueffing, M, Wildner, G, Stangassinger, M. 2007b. CRALBP is a highly prevalent autoantigen for human autoimmune uveitis. *Clin Dev Immunol* **2007**: 39245.
- Deeg, CA, Reese, S, Gerhards, H, Wildner, G, Kaspers, B. 2004. The uveitogenic potential of retinal S-antigen in horses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**: 2286-2292.
- Deeg, CA, Thureau, SR, Gerhards, H, Ehrenhofer, M, Wildner, G, Kaspers, B. 2002b. Uveitis in horses induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein is similar to the spontaneous disease. *Eur J Immunol* **32**: 2598-2606.
- Degroote, RL, Hauck, SM, Kremmer, E, Amann, B, Ueffing, M, Deeg, CA. 2012. Altered expression of talin 1 in peripheral immune cells points to a significant role of the innate immune system in spontaneous autoimmune uveitis. *J Proteomics* **75**: 4536-4544.
- Deng, Y, Li, B, Liu, F, Iqbal, K, Grundke-Iqbal, I, Brandt, R, Gong, CX. 2008. Regulation between O-GlcNAcylation and phosphorylation of neurofilament-M and their dysregulation in Alzheimer disease. *FASEB J* **22**: 138-145.
- Denniston, AK, Kottoor, SH, Khan, I, Oswal, K, Williams, GP, Abbott, J, Wallace, GR, Salmon, M, Rauz, S, Murray, PI, Curnow, SJ. 2011. Endogenous cortisol and TGF-beta in human aqueous humor contribute to ocular immune privilege by regulating dendritic cell function. *J Immunol* **186**: 305-311.
- DiLillo, DJ, Horikawa, M, Tedder, TF. 2011. B-lymphocyte effector functions in health and disease. *Immunol Res* **49**: 281-292.
- Duarte-Rey, C, Bogdanos, DP, Leung, PS, Anaya, JM, Gershwin, ME. 2012. IgM predominance in autoimmune disease: genetics and gender. *Autoimmun Rev* **11**: A404-412.

- Eberhardt, C, Amann, B, Feuchtinger, A, Hauck, SM, Deeg, CA. 2011. Differential expression of inwardly rectifying K⁺ channels and aquaporins 4 and 5 in autoimmune uveitis indicates misbalance in Muller glial cell-dependent ion and water homeostasis. *Glia* **59**: 697-707.
- Eberhardt, Christina. (2011): Die Bedeutung der Müllerzelle für die Pathogenese der equinen rezidivierenden Uveitis und Etablierung einer equinen Müllerzelllinie. Dissertation, LMU München: Tierärztliche Fakultät
- Ehrenhofer, MC, Deeg, CA, Reese, S, Liebich, HG, Stangassinger, M, Kaspers, B. 2002. Normal structure and age-related changes of the equine retina. *Vet Ophthalmol* **5**: 39-47.
- Ehrenstein, MR, Cook, HT, Neuberger, MS. 2000. Deficiency in serum immunoglobulin (Ig)M predisposes to development of IgG autoantibodies. *J Exp Med* **191**: 1253-1258.
- Ehrenstein, MR, Notley, CA. 2010. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat Rev Immunol* **10**: 778-786.
- Eisenfeld, AJ, Bunt-Milam, AH, Saari, JC. 1987. Uveoretinitis in rabbits following immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Exp Eye Res* **44**: 425-438.
- Elder, GA, Friedrich, VL, Jr., Bosco, P, Kang, C, Gourov, A, Tu, PH, Lee, VM, Lazzarini, RA. 1998. Absence of the mid-sized neurofilament subunit decreases axonal calibers, levels of light neurofilament (NF-L), and neurofilament content. *J Cell Biol* **141**: 727-739.
- Evoli, A, Tonali, PA, Padua, L, Monaco, ML, Scuderi, F, Batocchi, AP, Marino, M, Bartoccioni, E. 2003. Clinical correlates with anti-MuSK antibodies in generalized seronegative myasthenia gravis. *Brain* **126**: 2304-2311.
- Fahrenfort, I, Klooster, J, Sjoerdsma, T, Kamermans, M. 2005. The involvement of glutamate-gated channels in negative feedback from horizontal cells to cones. *Prog Brain Res* **147**: 219-229.
- Fathman, CG, Soares, L, Chan, SM, Utz, PJ. 2005. An array of possibilities for the study of autoimmunity. *Nature* **435**: 605-611.
- Faure, JP, Phuc, LH, Takano, S, Sterkers, M, Thillaye, B, de Kozak, Y. 1981. [Experimental uveoretinitis induced in monkeys by retinal S antigen. Induction, histopathology (author's transl)]. *J Fr Ophtalmol* **4**: 465-472.
- Fellah, JS, Wiles, MV, Charlemagne, J, Schwager, J. 1992. Evolution of vertebrate IgM: complete amino acid sequence of the constant region of *Ambystoma mexicanum* mu chain deduced from cDNA sequence. *Eur J Immunol* **22**: 2595-2601.
- Fourlanos, S, Perry, C, Gellert, SA, Martinuzzi, E, Mallone, R, Butler, J, Colman, PG, Harrison, LC. 2011. Evidence that nasal insulin induces immune tolerance to insulin in adults with autoimmune diabetes. *Diabetes* **60**: 1237-1245.

- Fox, GM, Kuwabara, T, Wiggert, B, Redmond, TM, Hess, HH, Chader, GJ, Gery, I. 1987. Experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) induced by retinal interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP): differences between EAU induced by IRBP and by S-antigen. *Clin Immunol Immunopathol* **43**: 256-264.
- Friede, RL, Samorajski, T. 1970. Axon caliber related to neurofilaments and microtubules in sciatic nerve fibers of rats and mice. *Anat Rec* **167**: 379-387.
- Fruhauf, B, Ohnesorge, B, Deegen, E, Boeve, M. 1998. Surgical management of equine recurrent uveitis with single port pars plana vitrectomy. *Vet Ophthalmol* **1**: 137-151.
- Gardner, SG, Gale, EA, Williams, AJ, Gillespie, KM, Lawrence, KE, Bottazzo, GF, Bingley, PJ. 1999. Progression to diabetes in relatives with islet autoantibodies. Is it inevitable? *Diabetes Care* **22**: 2049-2054.
- Garip, A, Diedrichs-Mohring, M, Thureau, SR, Deeg, CA, Wildner, G. 2009. Uveitis in a patient treated with Bacille-Calmette-Guerin: possible antigenic mimicry of mycobacterial and retinal antigens. *Ophthalmology* **116**: 2457-2462 e2451-2452.
- Gasparin, F, Takahashi, BS, Scolari, MR, Pedral, LS, Damico, FM. 2012. Experimental models of autoimmune inflammatory ocular diseases. *Arq Bras Oftalmol* **75**: 143-147.
- Gehlen, M, Regis, KC, Skare, TL. 2012. Demographic, clinical, laboratory and treatment characteristics of spondyloarthritis patients with and without acute anterior uveitis. *Sao Paulo Med J* **130**: 141-144.
- Gervasi, C, Thyagarajan, A, Szaro, BG. 2003. Increased expression of multiple neurofilament mRNAs during regeneration of vertebrate central nervous system axons. *J Comp Neurol* **461**: 262-275.
- Gery, I, Chanaud, NP, 3rd, Anglade, E. 1994. Recoverin is highly uveitogenic in Lewis rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **35**: 3342-3345.
- Gery, I, Wiggert, B, Redmond, TM, Kuwabara, T, Crawford, MA, Vistica, BP, Chader, GJ. 1986. Uveoretinitis and pinealitis induced by immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **27**: 1296-1300.
- Gilger, BC. 2010. Equine recurrent uveitis: the viewpoint from the USA. *Equine Vet J Suppl* **42 Suppl 37**: 57-61.
- Gilger, BC, Malok, E, Cutter, KV, Stewart, T, Horohov, DW, Allen, JB. 1999. Characterization of T-lymphocytes in the anterior uvea of eyes with chronic equine recurrent uveitis. *Vet Immunol Immunopathol* **71**: 17-28.
- Gilger, BC, Wilkie, DA, Davidson, MG, Allen, JB. 2001. Use of an intravitreal sustained-release cyclosporine delivery device for treatment of equine recurrent uveitis. *Am J Vet Res* **62**: 1892-1896.

- Goldman, JE, Yen, SH, Chiu, FC, Peress, NS. 1983. Lewy bodies of Parkinson's disease contain neurofilament antigens. *Science* **221**: 1082-1084.
- Gomes Bittencourt, M, Sepah, YJ, Do, DV, Agbedia, O, Akhtar, A, Liu, H, Akhlaq, A, Annam, R, Ibrahim, M, Nguyen, QD. 2012. New treatment options for noninfectious uveitis. *Dev Ophthalmol* **51**: 134-161.
- Gomez, AM, Van Den Broeck, J, Vrolix, K, Janssen, SP, Lemmens, MA, Van Der Esch, E, Duimel, H, Frederik, P, Molenaar, PC, Martinez-Martinez, P, De Baets, MH, Losen, M. 2010. Antibody effector mechanisms in myasthenia gravis-pathogenesis at the neuromuscular junction. *Autoimmunity* **43**: 353-370.
- Grant, KJ, Wu, CC. 2007. Advances in neuromembrane proteomics: efforts towards a comprehensive analysis of membrane proteins in the brain. *Brief Funct Genomic Proteomic* **6**: 59-69.
- Gregerson, DS, Abrahams, IW, Thirkill, CE. 1981. Serum antibody levels of uveitis patients to bovine retinal antigens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **21**: 669-680.
- Griffin, DO, Holodick, NE, Rothstein, TL. 2011. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70. *J Exp Med* **208**: 67-80.
- Gronwall, C, Akhter, E, Oh, C, Burlingame, RW, Petri, M, Silverman, GJ. 2012. IgM autoantibodies to distinct apoptosis-associated antigens correlate with protection from cardiovascular events and renal disease in patients with SLE. *Clin Immunol* **142**: 390-398.
- Haghighi, S, Andersen, O, Oden, A, Rosengren, L. 2004. Cerebrospinal fluid markers in MS patients and their healthy siblings. *Acta Neurol Scand* **109**: 97-99.
- Hamza, N, Bos, NA, Kallenberg, CG. 2012. B-cell populations and sub-populations in Sjogren's syndrome. *Presse Med*. **41**: e475-483.
- Han, F, Bulman, DE, Panisset, M, Grimes, DA. 2005. Neurofilament M gene in a French-Canadian population with Parkinson's disease. *Can J Neurol Sci* **32**: 68-70.
- Hauck, SM, Dietter, J, Kramer, RL, Hofmaier, F, Zipplies, JK, Amann, B, Feuchtinger, A, Deeg, CA, Ueffing, M. 2010. Deciphering membrane-associated molecular processes in target tissue of autoimmune uveitis by label-free quantitative mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* **9**: 2292-2305.
- Hauck, SM, Hofmaier, F, Dietter, J, Swadzba, ME, Blindert, M, Amann, B, Behler, J, Kremmer, E, Ueffing, M, Deeg, CA. 2012b. Label-free LC-MSMS analysis of vitreous from autoimmune uveitis reveals a significant decrease in secreted Wnt signalling inhibitors DKK3 and SFRP2. *J Proteomics* **75**: 4545-4554.
- Hauck, SM, Schoeffmann, S, Amann, B, Stangassinger, M, Gerhards, H, Ueffing, M, Deeg, CA. 2007. Retinal Mueller glial cells trigger the hallmark inflammatory process in autoimmune uveitis. *J Proteome Res* **6**: 2121-2131.

- Heimburg-Molinaro, J, Rittenhouse-Olson, K. 2009. Development and characterization of antibodies to carbohydrate antigens. *Methods Mol Biol* **534**: 341-357.
- Heinlen, LD, McClain, MT, Merrill, J, Akbarali, YW, Edgerton, CC, Harley, JB, James, JA. 2007. Clinical criteria for systemic lupus erythematosus precede diagnosis, and associated autoantibodies are present before clinical symptoms. *Arthritis Rheum* **56**: 2344-2351.
- Henney, AM. 2012. The promise and challenge of personalized medicine: aging populations, complex diseases, and unmet medical need. *Croat Med J* **53**: 207-210.
- Higuchi, O, Hamuro, J, Motomura, M, Yamanashi, Y. 2011. Autoantibodies to low-density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis. *Ann Neurol* **69**: 418-422.
- Hill, WD, Lee, VM, Hurtig, HI, Murray, JM, Trojanowski, JQ. 1991. Epitopes located in spatially separate domains of each neurofilament subunit are present in Parkinson's disease Lewy bodies. *J Comp Neurol* **309**: 150-160.
- Hines, MT. 1984. Immunologically mediated ocular disease in the horse. *Vet Clin North Am Large Anim Pract* **6**: 501-512.
- Hirose, S, Wiggert, B, Redmond, TM, Kuwabara, T, Nussenblatt, RB, Chader, GJ, Gery, I. 1987. Uveitis induced in primates by IRBP: humoral and cellular immune responses. *Exp Eye Res* **45**: 695-702.
- Hisanaga, S, Hirokawa, N. 1988. Structure of the peripheral domains of neurofilaments revealed by low angle rotary shadowing. *J Mol Biol* **202**: 297-305.
- Hisanaga, S, Ikai, A, Hirokawa, N. 1990. Molecular architecture of the neurofilament. I. Subunit arrangement of neurofilament L protein in the intermediate-sized filament. *J Mol Biol* **211**: 857-869.
- Hoekzema, R, Hwan, SB, Rothova, A, van Haren, MA, Donoso, LA, Kijlstra, A. 1990. Serum antibody response to human and bovine IRBP in uveitis. *Curr Eye Res* **9**: 1177-1183.
- Hoffman, PN, Cleveland, DW. 1988. Neurofilament and tubulin expression recapitulates the developmental program during axonal regeneration: induction of a specific beta-tubulin isotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 4530-4533.
- Hoffman, PN, Griffin, JW, Price, DL. 1984. Control of axonal caliber by neurofilament transport. *J Cell Biol* **99**: 705-714.
- Hofmaier, F, Hauck, SM, Amann, B, Degroote, RL, Deeg, CA. 2011. Changes in matrix metalloproteinase network in a spontaneous autoimmune uveitis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**: 2314-2320.

- Ishikawa, H, Bischoff, R, Holtzer, H. 1968. Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle. *J Cell Biol* **38**: 538-555.
- Jacomy, H, Zhu, Q, Couillard-Despres, S, Beaulieu, JM, Julien, JP. 1999. Disruption of type IV intermediate filament network in mice lacking the neurofilament medium and heavy subunits. *J Neurochem* **73**: 972-984.
- Jha, P, Sohn, JH, Xu, Q, Nishihori, H, Wang, Y, Nishihori, S, Manickam, B, Kaplan, HJ, Bora, PS, Bora, NS. 2006. The complement system plays a critical role in the development of experimental autoimmune anterior uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**: 1030-1038.
- Joachim, SC, Pfeiffer, N, Grus, FH. 2005. Autoantibodies in patients with glaucoma: a comparison of IgG serum antibodies against retinal, optic nerve, and optic nerve head antigens. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **243**: 817-823.
- Kalsow, CM, Dubielzig, RR, Dwyer, AE. 1999. Immunopathology of pineal glands from horses with uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**: 1611-1615.
- Kalsow, CM, Dwyer, AE. 1998. Retinal immunopathology in horses with uveitis. *Ocul Immunol Inflamm* **6**: 239-251.
- Kalsow, CM, Dwyer, AE, Smith, AW, Nifong, TP. 1992. Pinealitis coincident with recurrent uveitis: immunohistochemical studies. *Curr Eye Res* **11 Suppl**: 147-151.
- Kalsow, CM, Dwyer, AE, Smith, AW, Nifong, TP. 1993. Pinealitis accompanying equine recurrent uveitis. *Br J Ophthalmol* **77**: 46-48.
- Kalsow, CM, Wacker, WB. 1973. Localization of a uveitogenic soluble retinal antigen in the normal guinea pig eye by an indirect fluorescent antibody technique. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **44**: 11-20.
- Kalsow, CM, Wacker, WB. 1975. Use of immunofluorescent localization in the normal guinea pig eye to differentiate three autoantisera. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **48**: 287-293.
- Kalsow, CM, Wacker, WB. 1978. Pineal gland involvement in retina-induced experimental allergic uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **17**: 774-783.
- Kalsow, CM, Wacker, WB. 1986. Rabbit ocular and pineal autoimmune response to retina antigens. *Curr Eye Res* **5**: 579-586.
- Katsimpris, JM, Theoulakis, PE, Lepidas, J, Livieratou, A, Petropoulos, IK. 2011. Vogt-koyanagi-harada syndrome manifestations and diagnosis. *Klin Monbl Augenheilkd* **228**: 368-371.
- Katsumata, Y, Kawaguchi, Y, Baba, S, Hattori, S, Tahara, K, Ito, K, Iwasaki, T, Yamaguchi, N, Oyama, M, Kozuka-Hata, H, Hattori, H, Nagata, K, Yamanaka, H, Hara, M. 2011. Identification of three new autoantibodies associated with systemic lupus erythematosus using two proteomic approaches. *Mol Cell Proteomics* **10**: doi: 10.1074/mcp.M110.005330

- Khairallah, M. 2010. Are the Standardization of the Uveitis Nomenclature (SUN) Working Group criteria for codifying the site of inflammation appropriate for all uveitis problems? Limitations of the SUN Working Group classification. *Ocul Immunol Inflamm* **18**: 2-4.
- Kidd, BA, Ho, PP, Sharpe, O, Zhao, X, Tomooka, BH, Kanter, JL, Steinman, L, Robinson, WH. 2008. Epitope spreading to citrullinated antigens in mouse models of autoimmune arthritis and demyelination. *Arthritis Res Ther* **10**: doi:10.1186/ar2523.
- Kijlstra, A, Hoekzema, R, vd Lelij, A, Doekes, G, Rothova, A. 1990. Humoral and cellular immune reactions against retinal antigens in clinical disease. *Curr Eye Res* **9 Suppl**: 85-89.
- Kim, SJ, Gershov, D, Ma, X, Brot, N, Elkon, KB. 2002. I-PLA(2) activation during apoptosis promotes the exposure of membrane lysophosphatidylcholine leading to binding by natural immunoglobulin M antibodies and complement activation. *J Exp Med* **196**: 655-665.
- Kim, Y, Caberoy, NB, Alvarado, G, Davis, JL, Feuer, WJ, Li, W. 2011. Identification of Hnrph3 as an autoantigen for acute anterior uveitis. *Clin Immunol* **138**: 60-66.
- Ko, AC, Brinton, JP, Mahajan, VB, Zimmerman, B, Brinton, GS, Stone, EM, Folk, JC, Mullins, RF. 2011. Seroreactivity against aqueous-soluble and detergent-soluble retinal proteins in posterior uveitis. *Arch Ophthalmol* **129**: 415-420.
- Kondo, Y, Fukuda, K, Suzuki, K, Nishida, T. 2012. Chronic noninfectious uveitis associated with Vogt-Koyanagi-Harada disease treated with low-dose weekly systemic methotrexate. *Jpn J Ophthalmol* **56**: 104-106.
- Korf, HW, Moller, M, Gery, I, Zigler, JS, Klein, DC. 1985. Immunocytochemical demonstration of retinal S-antigen in the pineal organ of four mammalian species. *Cell Tissue Res* **239**: 81-85.
- Kotaniemi, K, Salla, H, Kautiainen, H. 2011. Long-term efficacy of adalimumab in the treatment of uveitis associated with juvenile idiopathic arthritis. *Clin Ophthalmol* **5**: 1425-1429.
- Krishnamoorthy, G, Saxena, A, Mars, LT, Domingues, HS, Mentele, R, Ben-Nun, A, Lassmann, H, Dornmair, K, Kurschus, FC, Liblau, RS, Wekerle, H. 2009. Myelin-specific T cells also recognize neuronal autoantigen in a transgenic mouse model of multiple sclerosis. *Nat Med* **15**: 626-632.
- Kruger, R, Fischer, C, Schulte, T, Strauss, KM, Muller, T, Voitalla, D, Berg, D, Hungs, M, Gobbele, R, Berger, K, Epplen, JT, Riess, O, Schols, L. 2003. Mutation analysis of the neurofilament M gene in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* **351**: 125-129.
- Kuhle, J, Leppert, D, Petzold, A, Regeniter, A, Schindler, C, Mehling, M, Anthony, DC, Kappos, L, Lindberg, RL. 2011. Neurofilament heavy chain in CSF correlates with relapses and disability in multiple sclerosis. *Neurology* **76**: 1206-1213.

- LaGasse, JM, Brantley, MS, Leech, NJ, Rowe, RE, Monks, S, Palmer, JP, Nepom, GT, McCulloch, DK, Hagopian, WA. 2002. Successful prospective prediction of type 1 diabetes in schoolchildren through multiple defined autoantibodies: an 8-year follow-up of the Washington State Diabetes Prediction Study. *Diabetes Care* **25**: 505-511.
- Lamb, MM, Yin, X, Zerbe, GO, Klingensmith, GJ, Dabelea, D, Fingerlin, TE, Rewers, M, Norris, JM. 2009. Height growth velocity, islet autoimmunity and type 1 diabetes development: the Diabetes Autoimmunity Study in the Young. *Diabetologia* **52**: 2064-2071.
- Larche, M, Wraith, DC. 2005. Peptide-based therapeutic vaccines for allergic and autoimmune diseases. *Nat Med* **11**: S69-76.
- Lavedan, C, Buchholtz, S, Nussbaum, RL, Albin, RL, Polymeropoulos, MH. 2002. A mutation in the human neurofilament M gene in Parkinson's disease that suggests a role for the cytoskeleton in neuronal degeneration. *Neurosci Lett* **322**: 57-61.
- Lehmann, PV, Forsthuber, T, Miller, A, Sercarz, EE. 1992. Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* **358**: 155-157.
- Lennon, VA, Kryzer, TJ, Pittock, SJ, Verkman, AS, Hinson, SR. 2005. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med* **202**: 473-477.
- Lennon, VA, Wingerchuk, DM, Kryzer, TJ, Pittock, SJ, Lucchinetti, CF, Fujihara, K, Nakashima, I, Weinshenker, BG. 2004. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* **364**: 2106-2112.
- Levy, RA, de Andrade, FA, Foeldvari, I. 2011. Cutting-edge issues in autoimmune uveitis. *Clin Rev Allergy Immunol* **41**: 214-223.
- Lewis, MJ, Wagner, B, Woof, JM. 2008. The different effector function capabilities of the seven equine IgG subclasses have implications for vaccine strategies. *Mol Immunol* **45**: 818-827.
- Louca, S. 2012. Personalized medicine--a tailored health care system: challenges and opportunities. *Croat Med J* **53**: 211-213.
- Luo, X, Lu, F, Wang, HL, Wang, N, Li, WH, Guo, N, Wang, HX, Xia, Q. 2012. Comparative autoantibody profiling before and after appearance of malignance: identification of anti-cathepsin D autoantibody as a promising diagnostic marker for lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **420**: 704-709.
- Malmstrom, C, Haghighi, S, Rosengren, L, Andersen, O, Lycke, J. 2003. Neurofilament light protein and glial fibrillary acidic protein as biological markers in MS. *Neurology* **61**: 1720-1725.

- Manickam, B, Jha, P, Hepburn, NJ, Morgan, BP, Harris, CL, Bora, PS, Bora, NS. 2010. Suppression of complement activation by recombinant Crry inhibits experimental autoimmune anterior uveitis (EAAU). *Mol Immunol* **48**: 231-239.
- Manickam, B, Jha, P, Matta, B, Liu, J, Bora, PS, Bora, NS. 2011. Inhibition of complement alternative pathway suppresses experimental autoimmune anterior uveitis by modulating T cell responses. *J Biol Chem* **286**: 8472-8480.
- Manson, JJ, Mauri, C, Ehrenstein, MR. 2005. Natural serum IgM maintains immunological homeostasis and prevents autoimmunity. *Springer Semin Immunopathol* **26**: 425-432.
- Martel, JN, Esterberg, E, Nagpal, A, Acharya, NR. 2012. Infliximab and adalimumab for uveitis. *Ocul Immunol Inflamm* **20**: 18-26.
- Maruyama, I, Ohguro, H, Ikeda, Y. 2000. Retinal ganglion cells recognized by serum autoantibody against gamma-enolase found in glaucoma patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**: 1657-1665.
- Masland, RH. 2001. The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci* **4**: 877-886.
- Mattapallil, MJ, Silver, PB, Mattapallil, JJ, Horai, R, Karabekian, Z, McDowell, JH, Chan, CC, James, EA, Kwok, WW, Sen, HN, Nussenblatt, RB, David, CS, Caspi, RR. 2011. Uveitis-associated epitopes of retinal antigens are pathogenic in the humanized mouse model of uveitis and identify autoaggressive T cells. *J Immunol* **187**: 1977-1985.
- McRae, BL, Vanderlugt, CL, Dal Canto, MC, Miller, SD. 1995. Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* **182**: 75-85.
- Meijer, JM, Meiners, PM, Vissink, A, Spijkervet, FK, Abdulahad, W, Kamminga, N, Brouwer, E, Kallenberg, CG, Bootsma, H. 2010. Effectiveness of rituximab treatment in primary Sjogren's syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* **62**: 960-968.
- Meyer, O, Combe, B, Elias, A, Benali, K, Clot, J, Sany, J, Eliaou, JF. 1997. Autoantibodies predicting the outcome of rheumatoid arthritis: evaluation in two subsets of patients according to severity of radiographic damage. *Ann Rheum Dis* **56**: 682-685.
- Meyers-Elliott, RH, Gammon, RA, Sumner, HL, Shimizu, I. 1983. Experimental retinal autoimmunity (ERA) in strain 13 guinea pigs: induction of ERA-retinopathy with rhodopsin. *Clin Immunol Immunopathol* **27**: 81-95.
- Mikucki, SA, Oblinger, MM. 1991. Corticospinal neurons exhibit a novel pattern of cytoskeletal gene expression after injury. *J Neurosci Res* **30**: 213-225.
- Miller, SD, Vanderlugt, CL, Begolka, WS, Pao, W, Yauch, RL, Neville, KL, Katz-Levy, Y, Carrizosa, A, Kim, BS. 1997. Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nat Med* **3**: 1133-1136.

- Mirshahi, M, Faure, JP, Brisson, P, Falcon, J, Guerlotte, J, Collin, J. 1984. S-antigen immunoreactivity in retinal rods and cones and pineal photosensitive cells. *Biol Cell* **52**: 195-198.
- Mochizuki, M, Charley, J, Kuwabara, T, Nussenblatt, RB, Gery, I. 1983. Involvement of the pineal gland in rats with experimental autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **24**: 1333-1338.
- Mochizuki, M, Kuwabara, T, McAllister, C, Nussenblatt, RB, Gery, I. 1985. Adoptive transfer of experimental autoimmune uveoretinitis in rats. Immunopathogenic mechanisms and histologic features. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **26**: 1-9.
- Moingeon, P, Mascarell, L. 2012. Induction of tolerance via the sublingual route: mechanisms and applications. *Clin Dev Immunol* **2012**: doi:10.1155/2012/623474
- Mond, JJ, Lees, A, Snapper, CM. 1995. T cell-independent antigens type 2. *Annu Rev Immunol* **13**: 655-692.
- Mosley, RL, Hutter-Saunders, JA, Stone, DK, Gendelman, HE. 2012. Inflammation and adaptive immunity in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**: doi: 10.1101/cshperspect.a009381
- Mowat, AM. 1999. Basic mechanisms and clinical implications of oral tolerance. *Curr Opin Gastroenterol* **15**: 546-556.
- Muma, NA, Hoffman, PN, Slunt, HH, Applegate, MD, Lieberburg, I, Price, DL. 1990. Alterations in levels of mRNAs coding for neurofilament protein subunits during regeneration. *Exp Neurol* **107**: 230-235.
- Nanto-Salonen, K, Kupila, A, Simell, S, Siljander, H, Salonsaari, T, Hekkala, A, Korhonen, S, Erkkola, R, Sipila, JI, Haavisto, L, Siltala, M, Tuominen, J, Hakalax, J, Hyoty, H, Ilonen, J, Veijola, R, Simell, T, Knip, M, Simell, O. 2008. Nasal insulin to prevent type 1 diabetes in children with HLA genotypes and autoantibodies conferring increased risk of disease: a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* **372**: 1746-1755.
- Ndhlovu, M, Preuss, BE, Dengjel, J, Stevanovic, S, Weiner, SM, Klein, R. 2011. Identification of alpha-tubulin as an autoantigen recognized by sera from patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Brain Behav Immun* **25**: 279-285.
- Neutzner, RV, Jager, M, Friedburg, C, Deeg, CA, Lorenz, B. 2011. [Blind spot enlargement syndrome in acute zonal occult outer retinopathy with detection of autoantibodies against the retinal antigens CRALBP and S-Ag]. *Ophthalmologe* **108**: 1045-1049.
- Nicaise-Roland, P, Nogueira, L, Demattei, C, de Chaisemartin, L, Rincheval, N, Cornillet, M, Grootenboer-Mignot, S, Dieude, P, Dougados, M, Cantagrel, A, Meyer, O, Serre, G, Chollet-Martin, S. 2012. Autoantibodies to citrullinated fibrinogen compared with anti-MCV and anti-CCP2 antibodies in diagnosing

- rheumatoid arthritis at an early stage: data from the French ESPOIR cohort. *Ann Rheum Dis*. doi:10.1136/annrheumdis-2011-201056.
- Nikolic, A, Djukic, P, Basta, I, Hajdukovic, L, Stojanovic, VR, Stevic, Z, Nikolic, D, Bozic, V, Lavrnic, S, Lavrnic, D. 2012. The predictive value of the presence of different antibodies and thymus pathology to the clinical outcome in patients with generalized myasthenia gravis. *Clin Neurol Neurosurg.*, in press, doi: 10.1016/j.clineuro.2012.06.013.
- Nussenblatt, RB, Gery, I, Ballintine, EJ, Wacker, WB. 1980a. Cellular immune responsiveness of uveitis patients to retinal S-antigen. *Am J Ophthalmol* **89**: 173-179.
- Nussenblatt, RB, Gery, I, Wacker, WB. 1980b. Experimental autoimmune uveitis: cellular immune responsiveness. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **19**: 686-690.
- Nussenblatt, RB, Kuwabara, T, de Monasterio, FM, Wacker, WB. 1981a. S-antigen uveitis in primates. A new model for human disease. *Arch Ophthalmol* **99**: 1090-1092.
- Nussenblatt, RB, Rodrigues, MM, Wacker, WB, Cevalero, SJ, Salinas-Carmona, MC, Gery, I. 1981b. Cyclosporin a. Inhibition of experimental autoimmune uveitis in Lewis rats. *J Clin Invest* **67**: 1228-1231.
- O'Rourke, DJ, DiJohnson, DA, Caiazzo, RJ, Jr., Nelson, JC, Ure, D, O'Leary, MP, Richie, JP, Liu, BC. 2012. Autoantibody signatures as biomarkers to distinguish prostate cancer from benign prostatic hyperplasia in patients with increased serum prostate specific antigen. *Clin Chim Acta* **413**: 561-567.
- Ogden, CA, Kowalewski, R, Peng, Y, Montenegro, V, Elkon, KB. 2005. IGM is required for efficient complement mediated phagocytosis of apoptotic cells in vivo. *Autoimmunity* **38**: 259-264.
- Paglia, DT, Miller, PE, Dubielzig, RR. 2004. James Wardrop and equine recurrent uveitis. *Arch Ophthalmol* **122**: 1218-1223.
- Palace, J, Leite, MI, Nairne, A, Vincent, A. 2010. Interferon Beta treatment in neuromyelitis optica: increase in relapses and aquaporin 4 antibody titers. *Arch Neurol* **67**: 1016-1017.
- Palestine, AG, Mc Allister, C, Carter, C, Keenan, AM, Vistica, B, Gery, I, Davey, R, Nussenblatt, R. 1986. Lymphocyte migration in the adoptive transfer of EAU. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **27**: 611-615.
- Papadopoulos, MC, Verkman, A. 2012. Aquaporin 4 and neuromyelitis optica. *Lancet Neurol* **11**: 535-544.
- Pease, ME, McKinnon, SJ, Quigley, HA, Kerrigan-Baumrind, LA, Zack, DJ. 2000. Obstructed axonal transport of BDNF and its receptor TrkB in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**: 764-774.

- Peichl, L, Gonzalez-Soriano, J. 1993. Unexpected presence of neurofilaments in axon-bearing horizontal cells of the mammalian retina. *J Neurosci* **13**: 4091-4100.
- Pennesi, G, Caspi, RR. 2002. Genetic control of susceptibility in clinical and experimental uveitis. *Int Rev Immunol* **21**: 67-88.
- Pennesi, G, Mattapallil, MJ, Sun, SH, Avichezer, D, Silver, PB, Karabekian, Z, David, CS, Hargrave, PA, McDowell, JH, Smith, WC, Wiggert, B, Donoso, LA, Chan, CC, Caspi, RR. 2003. A humanized model of experimental autoimmune uveitis in HLA class II transgenic mice. *J Clin Invest* **111**: 1171-1180.
- Perrot, R, Berges, R, Bocquet, A, Eyer, J. 2008. Review of the multiple aspects of neurofilament functions, and their possible contribution to neurodegeneration. *Mol Neurobiol* **38**: 27-65.
- Petzold, A, Junemann, A, Rejdak, K, Zarnowski, T, Thaler, S, Grieb, P, Kruse, FE, Zrenner, E, Rejdak, R. 2009. A novel biomarker for retinal degeneration: vitreous body neurofilament proteins. *J Neural Transm* **116**: 1601-1606.
- Pevzner, A, Schoser, B, Peters, K, Cosma, NC, Karakatsani, A, Schalke, B, Melms, A, Kroger, S. 2012. Anti-LRP4 autoantibodies in AChR- and MuSK-antibody-negative myasthenia gravis. *J Neurol* **259**: 427-435.
- Pleyer, U, Mackensen, F, Winterhalter, S, Stubiger, N. 2011. [Anti-TNF-alpha treatment for uveitis. Analysis of the current situation]. *Ophthalmologe* **108**: 13-20.
- Pollanen, MS, Bergeron, C, Weyer, L. 1993. Deposition of detergent-resistant neurofilaments into Lewy body fibrils. *Brain Res* **603**: 121-124.
- Quartier, P, Potter, PK, Ehrenstein, MR, Walport, MJ, Botto, M. 2005. Predominant role of IgM-dependent activation of the classical pathway in the clearance of dying cells by murine bone marrow-derived macrophages in vitro. *Eur J Immunol* **35**: 252-260.
- Rao, NA, Wacker, WB, Marak, GE, Jr. 1979. Experimental allergic uveitis: clinicopathologic features associated with varying doses of S antigen. *Arch Ophthalmol* **97**: 1954-1958.
- Regan, DP, Aarnio, MC, Davis, WS, Carmichael, KP, Vandenplas, ML, Lauderdale, JD, Moore, PA. 2012. Characterization of cytokines associated with Th17 cells in the eyes of horses with recurrent uveitis. *Vet Ophthalmol* **15**: 145-152.
- Reiber, H, Peter, JB. 2001. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci* **184**: 101-122.
- Reilly, MM, Murphy, SM, Laura, M. 2011. Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst* **16**: 1-14.
- Rio, J, Nos, C, Tintore, M, Tellez, N, Galan, I, Pelayo, R, Comabella, M, Montalban, X. 2006. Defining the response to interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* **59**: 344-352.

- Rodrigues, MM, Hackett, J, Gaskins, R, Wiggert, B, Lee, L, Redmond, M, Chader, GJ. 1986. Interphotoreceptor retinoid-binding protein in retinal rod cells and pineal gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **27**: 844-850.
- Roemer, SF, Parisi, JE, Lennon, VA, Benarroch, EE, Lassmann, H, Bruck, W, Mandler, RN, Weinshenker, BG, Pittock, SJ, Wingerchuk, DM, Lucchinetti, CF. 2007. Pattern-specific loss of aquaporin-4 immunoreactivity distinguishes neuromyelitis optica from multiple sclerosis. *Brain* **130**: 1194-1205.
- Rosenbaum, JT, Nozik, RA. 1985. Uveitis: many diseases, one diagnosis. *Am J Med* **79**: 545-547.
- Rudick, RA, Lee, JC, Simon, J, Ransohoff, RM, Fisher, E. 2004. Defining interferon beta response status in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* **56**: 548-555.
- Ruiz-Ederra, J, Garcia, M, Hicks, D, Vecino, E. 2004. Comparative study of the three neurofilament subunits within pig and human retinal ganglion cells. *Mol Vis* **10**: 83-92.
- Runkle, EA, Antonetti, DA. 2011. The blood-retinal barrier: structure and functional significance. *Methods Mol Biol* **686**: 133-148.
- Sakaguchi, T, Okada, M, Kitamura, T, Kawasaki, K. 1993. Reduced diameter and conduction velocity of myelinated fibers in the sciatic nerve of a neurofilament-deficient mutant quail. *Neurosci Lett* **153**: 65-68.
- Sakiyama, T, Fujita, H, Tsubouchi, H. 2008. Autoantibodies against ubiquitination factor E4A (UBE4A) are associated with severity of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **14**: 310-317.
- Sandmann, D, Boycott, BB, Peichl, L. 1996. Blue-cone horizontal cells in the retinae of horses and other equidae. *J Neurosci* **16**: 3381-3396.
- Sanui, H, Redmond, TM, Kotake, S, Wiggert, B, Tanaka, T, Chader, GJ, Gery, I. 1990. Uveitis and immune responses in primates immunized with IRBP-derived synthetic peptides. *Curr Eye Res* **9**: 193-199.
- Schalken, JJ, van Vugt, AH, Winkens, HJ, Bovee-Geurts, PH, De Grip, WJ, Broekhuysse, RM. 1988. Experimental autoimmune uveoretinitis in rats induced by rod visual pigment: rhodopsin is more pathogenic than opsin. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **226**: 255-261.
- Schroeder, HW, Jr., Cavacini, L. 2010. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* **125**: S41-52.
- Schwink, KL. 1992. Equine uveitis. *Vet Clin North Am Equine Pract* **8**: 557-574.
- Sellner, J, Boggild, M, Clanet, M, Hintzen, RQ, Illes, Z, Montalban, X, Du Pasquier, RA, Polman, CH, Sorensen, PS, Hemmer, B. 2010. EFNS guidelines on diagnosis and management of neuromyelitis optica. *Eur J Neurol* **17**: 1019-1032.

- Servat, JJ, Mears, KA, Black, EH, Huang, JJ. 2012. Biological agents for the treatment of uveitis. *Expert Opin Biol Ther* **12**: 311-328.
- Shanks, N, Greek, R, Greek, J. 2009. Are animal models predictive for humans? *Philos Ethics Humanit Med* **4**: doi:10.1186/1747-5341-4-2
- Shaw, G, Weber, K. 1984. The intermediate filament complement of the retina: a comparison between different mammalian species. *Eur J Cell Biol* **33**: 95-104.
- Shigemoto, K. 2007. Myasthenia gravis induced by autoantibodies against MuSK. *Acta Myol* **26**: 185-191.
- Sohn, JH, Kaplan, HJ, Suk, HJ, Bora, PS, Bora, NS. 2000. Chronic low level complement activation within the eye is controlled by intraocular complement regulatory proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**: 3492-3502.
- Sokolove, J, Bromberg, R, Deane, KD, Lahey, LJ, Derber, LA, Chandra, PE, Edison, JD, Gilliland, WR, Tibshirani, RJ, Norris, JM, Holers, VM, Robinson, WH. 2012. Autoantibody epitope spreading in the pre-clinical phase predicts progression to rheumatoid arthritis. *PLoS One* **7**: doi:10.1371/journal.pone.0035296
- Spiess, BM. 1997. [Equine recurrent uveitis]. *Schweiz Arch Tierheilkd* **139**: 126-133.
- Spiess, BM. 2010. Equine recurrent uveitis: the European viewpoint. *Equine Vet J Suppl* **42 Suppl 37**: 50-56.
- Stanley, HM, Norris, JM, Barriga, K, Hoffman, M, Yu, L, Miao, D, Erlich, HA, Eisenbarth, GS, Rewers, M. 2004. Is presence of islet autoantibodies at birth associated with development of persistent islet autoimmunity? The Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *Diabetes Care* **27**: 497-502.
- Staudt, A, Bohm, M, Knebel, F, Grosse, Y, Bischoff, C, Hummel, A, Dahm, JB, Borges, A, Jochmann, N, Wernecke, KD, Wallukat, G, Baumann, G, Felix, SB. 2002. Potential role of autoantibodies belonging to the immunoglobulin G-3 subclass in cardiac dysfunction among patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* **106**: 2448-2453.
- Staudt, A, Dorr, M, Staudt, Y, Bohm, M, Probst, M, Empen, K, Plotz, S, Maschke, HE, Hummel, A, Baumann, G, Felix, SB. 2005. Role of immunoglobulin G3 subclass in dilated cardiomyopathy: results from protein A immunoadsorption. *Am Heart J* **150**: 729-736.
- Steck, AK, Johnson, K, Barriga, KJ, Miao, D, Yu, L, Hutton, JC, Eisenbarth, GS, Rewers, MJ. 2011. Age of islet autoantibody appearance and mean levels of insulin, but not GAD or IA-2 autoantibodies, predict age of diagnosis of type 1 diabetes: diabetes autoimmunity study in the young. *Diabetes Care* **34**: 1397-1399.
- t Hart, BA, Amor, S, Jonker, M. 2004. Evaluating the validity of animal models for research into therapies for immune-based disorders. *Drug Discov Today* **9**: 517-524.

- Takeuchi, M. 2011. Immune tolerance and autoimmune uveoretinitis: the role of the ocular microenvironment. *Immunotherapy* **3**: 1103-1111.
- Taneja, V,David, CS. 1999. HLA class II transgenic mice as models of human diseases. *Immunol Rev* **169**: 67-79.
- Tappeiner, C, Moller, B, Hennig, M,Heiligenhaus, A. 2012. New biologic drugs: anti-interleukin therapy. *Dev Ophthalmol* **51**: 79-89.
- Taylor, AW,Kaplan, HJ. 2010. Ocular immune privilege in the year 2010: ocular immune privilege and uveitis. *Ocul Immunol Inflamm* **18**: 488-492.
- Taylor, S,Lightman, S. 2004. Recurrent anterior uveitis in patients with Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. *Arch Ophthalmol* **122**: 922-923.
- Tezel, G, Seigel, GM,Wax, MB. 1998. Autoantibodies to small heat shock proteins in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**. 2277-2287.
- Thrower, SL,Bingley, PJ. 2011. Prevention of type 1 diabetes. *Br Med Bull* **99**: 73-88.
- Tong, X, Chen, J, Liu, J, Pang, S,Zhai, Z. 1999. Assembly and structure of neurofilaments isolated from bovine spinal cord. *Sci China C Life Sci* **42**: 233-239.
- Tradtrantip, L, Zhang, H, Saadoun, S, Phuan, PW, Lam, C, Papadopoulos, MC, Bennett, JL,Verkman, AS. 2012. Anti-aquaporin-4 monoclonal antibody blocker therapy for neuromyelitis optica. *Ann Neurol* **71**: 314-322.
- Trumpler, J, Dedek, K, Schubert, T, de Sevilla Muller, LP, Seeliger, M, Humphries, P, Biel, M,Weiler, R. 2008. Rod and cone contributions to horizontal cell light responses in the mouse retina. *J Neurosci* **28**: 6818-6825.
- Tuohy, VK, Yu, M, Yin, L, Kawczak, JA, Johnson, JM, Mathisen, PM, Weinstock-Guttman, B,Kinkel, RP. 1998. The epitope spreading cascade during progression of experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunol Rev* **164**: 93-100.
- Uzawa, A, Mori, M, Hayakawa, S, Masuda, S,Kuwabara, S. 2010. Different responses to interferon beta-1b treatment in patients with neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *Eur J Neurol* **17**: 672-676.
- van der Velden, MA. 2004. [Moon blindness (Equine Recurrent Uveitis) in the horse]. *Tijdschr Diergeneeskd* **129**: 153-157.
- Vanderlugt, CL,Miller, SD. 2002. Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **2**: 85-95.
- Villar, LM, Masjuan, J, Gonzalez-Porque, P, Plaza, J, Sadaba, MC, Roldan, E, Bootello, A,Alvarez-Cermeno, JC. 2003. Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Ann Neurol* **53**: 222-226.

- Vistica, BP, Usui, M, Kuwabara, T, Wiggert, B, Lee, L, Redmond, TM, Chader, GJ, Gery, I. 1987. IRBP from bovine retina is poorly uveitogenic in guinea pigs and is identical to A-antigen. *Curr Eye Res* **6**: 409-417.
- Vos, Q, Lees, A, Wu, ZQ, Snapper, CM, Mond, JJ. 2000. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunol Rev* **176**: 154-170.
- Vosslamber, S, van der Voort, LF, van den Elskamp, IJ, Heijmans, R, Aubin, C, Uitdehaag, BM, Crusius, JB, van der PouwKraan, TC, Comabella, M, Montalban, X, Hafler, DA, De Jager, PL, Killestein, J, Polman, CH, Verweij, CL. 2011. Interferon regulatory factor 5 gene variants and pharmacological and clinical outcome of Interferonbeta therapy in multiple sclerosis. *Genes Immun* **12**: 466-472.
- Wacker, WB. 1973. Experimental allergic uveitis. Studies on characterization and isolation of the pathogenic retina antigen. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **45**: 639-656.
- Wacker, WB, Donoso, LA, Kalsow, CM, Yankeelov, JA, Jr., Organisciak, DT. 1977. Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. *J Immunol* **119**: 1949-1958.
- Wacker, WB, Kalsow, CM. 1973. Autoimmune uveo-retinitis in the rat sensitized with retina photoreceptor cell antigen. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **45**: 582-592.
- Wacker, WB, Lipton, MM. 1965. Experimental allergic uveitis: homologous retina as uveitogenic antigen. *Nature* **206**: 253-254.
- Wacker, WB, Lipton, MM. 1968a. Experimental allergic uveitis. I. Production in the guinea pig and rabbit by immunization with retina in adjuvant. *J Immunol* **101**: 151-156.
- Wacker, WB, Lipton, MM. 1968b. Experimental allergic uveitis. II. Serologic and hypersensitive responses of the guinea pig following immunization with homologous retina. *J Immunol* **101**: 157-165.
- Wacker, WB, Lipton, MM. 1971. The role of two retina antigens in production of experimental allergic uveitis and its suppression by mycobacteria. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **41**: 370-380.
- Wacker, WB, Lipton, MM, Ongchua, FE. 1964. Antibody Production in the Guinea Pig to Homologous Uvea. *Proc Soc Exp Biol Med* **117**: 150-154.
- Wagner, B. 2006. Immunoglobulins and immunoglobulin genes of the horse. *Dev Comp Immunol* **30**: 155-164.
- Warraich, RS, Dunn, MJ, Yacoub, MH. 1999. Subclass specificity of autoantibodies against myosin in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy: pro-inflammatory antibodies in DCM patients. *Biochem Biophys Res Commun* **259**: 255-261.

- Warraich, RS, Noutsias, M, Kazak, I, Seeberg, B, Dunn, MJ, Schultheiss, HP, Yacoub, MH, Kuhl, U. 2002. Immunoglobulin G3 cardiac myosin autoantibodies correlate with left ventricular dysfunction in patients with dilated cardiomyopathy: immunoglobulin G3 and clinical correlates. *Am Heart J* **143**: 1076-1084.
- Wasserfall, CH, Atkinson, MA. 2006. Autoantibody markers for the diagnosis and prediction of type 1 diabetes. *Autoimmun Rev* **5**: 424-428.
- Wax, MB. 2011. The case for autoimmunity in glaucoma. *Exp Eye Res* **93**: 187-190.
- Werry, H, Gerhards, H. 1992. [The surgical therapy of equine recurrent uveitis]. *Tierarztl Prax* **20**: 178-186.
- Wiggert, B, Lee, L, Rodrigues, M, Hess, H, Redmond, TM, Chader, GJ. 1986. Immunochemical distribution of interphotoreceptor retinoid-binding protein in selected species. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **27**: 1041-1049.
- Witzmann, P. 1975. [Therapy of periodic ophthalmia (moon blindness) in the horse]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* **82**: 1-4.
- Xu, Z, Marszalek, JR, Lee, MK, Wong, PC, Folmer, J, Crawford, TO, Hsieh, ST, Griffin, JW, Cleveland, DW. 1996. Subunit composition of neurofilaments specifies axonal diameter. *J Cell Biol* **133**: 1061-1069.
- Xu, Z, Zan, H, Pone, EJ, Mai, T, Casali, P. 2012. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat Rev Immunol* **12**: 517-531.
- Yager, RH, Gochenour, WS, Jr., Wetmore, PW. 1950. Recurrent iridocyclitis (periodic ophthalmia) of horses; agglutination and lysis of leptospiras by serums deriving from horses affected with recurrent iridocyclitis. *J Am Vet Med Assoc* **117**: 207-209.
- Yano, T, Yamada, K, Kimura, A, Takeshita, T, Minohara, M, Kira, J, Senju, S, Nishimura, Y, Tanihara, H. 2005. Autoimmunity against neurofilament protein and its possible association with HLA-DRB1*1502 allele in glaucoma. *Immunol Lett* **100**: 164-169.
- Yu, M, Johnson, JM, Tuohy, VK. 1996. A predictable sequential determinant spreading cascade invariably accompanies progression of experimental autoimmune encephalomyelitis: a basis for peptide-specific therapy after onset of clinical disease. *J Exp Med* **183**: 1777-1788.
- Yuan, A, Rao, MV, Sasaki, T, Chen, Y, Kumar, A, Veeranna, Liem, RK, Eyer, J, Peterson, AC, Julien, JP, Nixon, RA. 2006. Alpha-internexin is structurally and functionally associated with the neurofilament triplet proteins in the mature CNS. *J Neurosci* **26**: 10006-10019.
- Yum, SW, Zhang, J, Mo, K, Li, J, Scherer, SS. 2009. A novel recessive Nefl mutation causes a severe, early-onset axonal neuropathy. *Ann Neurol* **66**: 759-770.

- Zhang, B, Tzartos, JS, Belimezi, M, Ragheb, S, Bealmear, B, Lewis, RA, Xiong, WC, Lisak, RP, Tzartos, SJ, Mei, L. 2012. Autoantibodies to lipoprotein-related protein 4 in patients with double-seronegative myasthenia gravis. *Arch Neurol* **69**: 445-451.
- Zhou, R, Horai, R, Mattapallil, MJ, Caspi, RR. 2011. A new look at immune privilege of the eye: dual role for the vision-related molecule retinoic acid. *J Immunol* **187**: 4170-4177.
- Zhu, Q, Couillard-Despres, S, Julien, JP. 1997. Delayed maturation of regenerating myelinated axons in mice lacking neurofilaments. *Exp Neurol* **148**: 299-316.
- Zipplies, JK, Hauck, SM, Eberhardt, C, Hirmer, S, Amann, B, Stangassinger, M, Ueffing, M, Deeg, CA. 2012. Miscellaneous vitreous-derived IgM antibodies target numerous retinal proteins in equine recurrent uveitis. *Vet Ophthalmol*. **15 Suppl 2**:57-64
- Zipplies, JK, Hauck, SM, Schoeffmann, S, Amann, B, van der Meijden, CH, Stangassinger, M, Ueffing, M, Deeg, CA. 2010a. Kininogen in autoimmune uveitis: decrease in peripheral blood stream versus increase in target tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**: 375-382.
- Zipplies, JK, Kirschfink, M, Amann, B, Hauck, SM, Stangassinger, M, Deeg, CA. 2010b. Complement factor B expression profile in a spontaneous uveitis model. *Immunobiology* **215**: 949-955.

Gesetzestexte wurden abgerufen über folgende Webseiten:

BGB, alte Fassung, geltend bis zum 31.12.2001:

<http://dejure.org/gesetze/0BGB010102> (zuletzt geprüft 21. März 2013)

BGB, aktuelle Fassung:

<http://dejure.org/gesetze/BGB> (zuletzt geprüft 21. März 2013)

Kaiserliche Verordnung betreffend die Hauptmängel und Gewährfristen beim Viehhandel vom 27. März 1899:

http://de.wikisource.org/wiki/Verordnung,_betreffend_die_Hauptmängel_und_Gewährfristen_beim_Viehhandel (zuletzt geprüft 21. März 2013)

DANKSAGUNG

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Manfred Stangassinger, bei ihm möchte ich mich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und für den Arbeitsplatz, der mir am Institut für Tierphysiologie zur Verfügung gestellt wurde, bedanken.

Ein besonderes Dankeschön gilt meiner Betreuerin Frau PD Dr. Cornelia A. Deeg. Sie hat mir die Chance gegeben, an diesem Thema zu arbeiten, war eine großzügige, geduldige und fachlich überragend gute Betreuerin und hat mit großem persönlichen Engagement über der Entstehung dieser Arbeit gewacht. Auch hat sie mir ermöglicht, diese Arbeit in einer renommierten Fachzeitschrift zu publizieren und durch Teilnahme an Tagungen und meinen Horizont zu erweitern. Vielen Dank für alles!

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Frau Dr. Stefanie M. Hauck bedanken, dafür, dass ich Gerätschaften am Helmholtz Zentrum nutzen durfte, für ihre fachliche Unterstützung, für ihre Großzügigkeit und nicht zuletzt dafür, dass Diskussionen mit ihr immer ein Gefühl der Ermutigung hinterlassen haben.

Allen Mitarbeitern des Helmholtz Zentrums möchte ich ebenfalls für ihre Unterstützung und ihre Gastfreundlichkeit zu verschiedensten Gelegenheiten danken.

Frau Bärbl Amann und Frau Sieglinde Hirmer möchte ich dafür danken, dass sie angeblich nie etwas wissen, aber doch alles können. Bei Frau Sieglinde Hirmer möchte ich mich besonders dafür bedanken, dass sie auch noch nach dem dritten Mal Erzählen über meine Volker-Pispers-Zitate lachen kann. Frau Barbara Amann wünsche ich ein Medallion, das sie auf ihren künftigen Fahrten vor Seekrankheit bewahrt.

Meinen wunderbaren Kollegen am Institut möchte ich für das tolle Arbeitsklima sowie zahlreiche fröhliche Abende danken, insbesondere möchte ich den Kollegen in meiner Arbeitsgruppe, nämlich Roxane Degroote, Christina Eberhardt, Kerstin Euler, Christoph Szober, Kristina Fröhlich und Gudrun Treutlein für ihre Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen danken. Bedanken möchte ich mich auch bei Carmen Ehrmann, Ute Klein und Nina Burkhardt für ihre Unterstützung im Labor.

Ein besonderes Dankeschön gilt auch Hanna Zipplies, die mir vieles beigebracht hat und ohne die diese Arbeit mit Sicherheit nicht so gut gelungen wäre.

Ein Dank geht auch an alle ehemaligen Doktoranden meiner Arbeitsgruppe und das „Erbe“, das sie hinterlassen haben.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir ein sorgenfreies Studium ermöglicht hat und mich immer, bei all meinen Vorhaben unterstützt hat und deren Mitgliedern diese Arbeit gewidmet ist.